

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA MANTELATO NEIVA

Anticarsia gemmatalis Hübner, 1818 (LEPIDOPTERA: EREBIDAE) NO
BRASIL: DIVERSIDADE GENÉTICA, SUSCETIBILIDADE A BIOINSETICIDAS E
PROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM AÇÃO SINÉRGICA

CURITIBA

2021

MARIANA MANTELATO NEIVA

Anticarsia gemmatalis Hübner, 1818 (LEPIDOPTERA: EREBIDAE) NO
BRASIL: DIVERSIDADE GENÉTICA, SUSCETIBILIDADE A BIOINSETICIDAS E
PROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM AÇÃO SINÉRGICA

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Neiva, Mariana Mantelato.

Anticarsia gemmatalis Hübner, 1818 (LEPIDOPTERA: EREBIDAE) NO
BRASIL: DIVERSIDADE GENÉTICA, SUSCETIBILIDADE A
BIOINSETICIDAS E PROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM AÇÃO
SINÉRGICA. / Mariana Mantelato Neiva. – Curitiba, 2021.
109 f. : il.

Orientador: Daniel Ricardo Sosa-Gómez.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Entomologia).

1. Lagartas. 2. Soja – Doenças e pragas. 3. Proteínas. 4. Genética de
populações. 5. *Anticarsia gemmatalis*. 6. Inseticidas – Testes. I. Título. II.
Sosa-Gómez, Daniel Ricardo. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Entomologia).

CDD (20. ed.) 633.34



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ENTOMOLOGIA) - 40001016005P5

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ENTOMOLOGIA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MARIANA MANTELATO NEIVA** intitulada: *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (LEPIDOPTERA: EREBIDAE) NO BRASIL: DIVERSIDADE GENÉTICA, SUSCETIBILIDADE A BIOINSETICIDAS E PROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM AÇÃO SINÉRGICA, sob orientação do Prof. Dr. DANIEL RICARDO SOSA GÓMEZ, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Abril de 2021.

Assinatura Eletrônica

30/04/2021 14:04:06.0

DANIEL RICARDO SOSA GÓMEZ
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

29/04/2021 15:17:33.0

SARA MATAROLI DE GODOY
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)

Assinatura Eletrônica

29/04/2021 15:15:11.0

ALEXANDRE SPECHT
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

29/04/2021 15:55:48.0

MARIO ANTONIO NAVARRO DA SILVA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Departamento de Zoologia - Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1763 - E-mail: pgento@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 90196

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 90196

À ciência!

A todos que fazem ciência e acreditam
que tempos melhores virão.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e disposição para concluir mais um ciclo.

Aos meus pais, Nelson e Nilva, que sempre estiveram ao meu lado e por todos os ensinamentos ao longo da vida.

Às minhas irmãs, Alexandra, Roberta e Juliana, meu cunhado Bruno e minha sogra Consuelo, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.

Ao meu marido Eric, por todo companheirismo, por sempre me incentivar, apoiar e acreditar em mim. Principalmente, nesses longos quatro anos que passamos longe um do outro. AMO VOCÊ!

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade de realizar o doutorado e aos professores do programa por todos os ensinamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez, pela confiança, orientação e, principalmente, pelo incentivo e participação na minha vida científica.

À Dra. e querida amiga Maria Cristina Neves de Oliveira por sua paciência e valiosa contribuição nas análises estatísticas do meu trabalho e por estar sempre disponível para ensinar.

Ao Dr. Eliseu Binneck, pela contribuição no desenvolvimento dos primers e toda atenção a mim prestada.

À Dra. Suely Ruiz Giolo, do Departamento de Estatística da Universidade Federal do Paraná pela contribuição das análises estatísticas.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Soja), pela estrutura física e disponibilização dos materiais necessários para a realização dos experimentos.

À equipe técnica dos laboratórios de entomologia da Embrapa Soja: Ivanilda Soldório, Sérgio H. da Silva, Jovenil José da Silva, Miguel Pereira de Souza, e, principalmente, Fabio E. Paro (in memorian) e José Jairo da Silva, pela amizade e ensinamentos durante os experimentos.

À equipe de campo da Embrapa Soja, Oriverton Tonon, Adriano dos Santos e Wilson Pozenato (in memorian), pela ajuda e disponibilidade nas coletas e experimentos no campo.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), pela estrutura física para parte dos experimentos e à professora Claudete F. Ruas pela parceria.

À amiga e Dra. Sara M. de Godoy, pela amizade e por toda ajuda e ensinamentos e também pelo tempo que se dedicou ao meu trabalho.

À Daniele Cassiano Feliciano, pela amizade e por toda ajuda nos experimentos na UEL.

À amiga e Dra. Bruna Delgado Góes, pela amizade e por compartilhar materiais e todo seu conhecimento.

Ao amigo e companheiro de laboratório Rodrigo Maciel, por toda ajuda e contribuição no final da minha tese.

Às minhas amigas, irmãs de alma, Vanessa Lacerda, Beatriz L. Guelfi, Amanda Zilli, Grazielle Souza, Bruna Góes e Karla Fumière por todas as conversas, conselhos e amor.

Ao melhor grupo que a esquerda poderia ter, minhas companheiras Ana Karina Andurchuka, Lorena Andurchuka e Viviam Franco muito obrigada por todos os momentos, conversas e desabafos. Vocês foram uma das minhas grandes alegrias desses quatro anos. Ninguém solta a mão de ninguém!

Aos grandes amigos que a entomologia me trouxe: Ana Paula de Queiroz, Marcela L. M. Grande, Jaciara Gonçalves, Rafael Hayashida, Rodrigo Maciel e Fernanda Colombo, pela confiança, amizade, companheirismo e por todos momentos alegres.

A todos os membros da banca, Dra. Sara Mataroli de Godoy, Dr. Alexandre Specht e Dr. Mario Navarro, por todas as contribuições e palavras de incentivo.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

"Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite.

Que a liberdade seja nossa própria substância,

já que viver é ser livre."

(Simone de Beauvoir)

RESUMO

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, há décadas, apresenta crescimento em área e produção e, esta expansão mundial, é resultado da estruturação de um sólido mercado internacional. Com extensas áreas cultivadas, esta cultura está exposta ao ataque de insetos-praga que podem causar danos no estágio reprodutivo e vegetativo da planta. *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae) destaca-se por atacar a cultura e comprometer sua produtividade. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética e a suscetibilidade de *A. gemmatalis* a inseticidas biológicos utilizados no seu controle em aplicações conjuntas ou sequenciais com substâncias com prospecção sinérgica com a finalidade de aprimorar a eficiência de bioinseticidas e o manejo da resistência desta espécie. Concentrações variando de 0,025% a 1,5% de ácido bórico, Calcofluor White Stain, Fluorescent Brightener 28 - FB 28 e Umbeliferona, em combinação com isolados de AgMNPV e produtos à base de *Bacillus thuringiensis* (Dipel®, Xentari® e Agree®) foram incorporados na dieta artificial. Os tratamentos foram oferecidos a lagartas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistente à proteína Cry1Ac. Os dados indicaram resposta do branqueador óptico Fluorescent Brightener 28 na concentração 0,1%, que em mistura com os bioinseticidas, ocasionou incremento da mortalidade (sinergismo) na população resistente de *A. gemmatalis*. Os resultados deste estudo além de ser uma alternativa para tornar os produtos para o controle de *A. gemmatalis* mais eficazes e reduzir o custo de produção, também podem abrir caminhos para novas pesquisas e a descoberta de novas substâncias com ação sinérgica, o que permite as empresas melhorar a qualidade dos seus produtos. Por fim, avaliou-se a estrutura e diversidade genética de *A. gemmatalis* provenientes em diferentes regiões produtoras de soja no Brasil por meio de marcadores microssatélites. Foram analisados um total de 134 alelos em 155 indivíduos amostrados. A heterozigosidade observada (H_o) global foi menor do que a heterozigosidade média esperada (H_e) global, o que indica desvio nas proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg para todas as populações amostradas. A maior parte da variação genética foi encontrada dentro das populações e o índice de diferenciação genética (F_{ST}) foi moderado entre as mesmas. A correlação entre distâncias geográficas e distâncias genéticas foi negativa, porém não significativa. Valores positivos e significativos de coeficiente de endogamia (F_{IS}) foram encontrados para a maioria das populações. Não foi verificado efeito de gargalo recente nas cinco populações amostradas. A análise bayesiana de agrupamento genético, a Neighbor-Net e PCoA indicaram a formação de dois e quatro grupos genéticos, respectivamente. Na análise aplicando Neighbor-Net um cluster foi formado pelas populações de Bahia (LemBA) e Mato Grosso (NsjMT) e o segundo cluster composto pelas populações de Goiás (MoGO), Londrina (LonPR) e Rio Grande do Sul (CaRS). Para a análise de coordenadas principais (PCoA) o primeiro cluster formado por LemBA; o segundo cluster formado NsjMT; o terceiro cluster formado por MoGO e LonPR; e um quarto cluster formado por CaRS. As populações não encontram-se estruturadas, indicando fluxo gênico entre elas. Esses resultados enriquecem a

biblioteca de microssatélites com a construção e validação de nove primers para *A. gemmatalis*, e ainda contribuem para o manejo regional da espécie trazendo dados sobre as taxas de fluxo gênico entre as populações, uma vez que, a eficiência da soja Bt depende da taxa de dispersão dos alelos suscetíveis entre a área de refúgio e campos transgênicos. Com aumento da área cultivada com soja e outras culturas hospedeiras, geneticamente modificadas, estes estudos visam contribuir para o manejo integrado de *A. gemmatalis*.

Palavras-chave: Lagarta-da-soja 1. Branqueadores ópticos 2. Proteína Cry1Ac 3. Genética de populações 4. Manejo de Resistência 5.

ABSTRACT

Soy, *Glycine max* (L.) Merrill, has been showing an increase in area and production for decades, and this worldwide expansion is the result of the structuring of a solid international market. With extensive cultivated areas, this crop is exposed to the attack of insect pests that can cause damage in the reproductive and vegetative stages of the plant. *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidæ) stands out for attack and compromise crop productivity. Therefore, the aim of this study was to evaluate the genetic diversity and the susceptibility of *A. gemmatalis* to biological insecticides used in its control in joint or sequential applications with substances with synergistic prospecting in order to improve the bioinsecticides efficiency and the management of this species resistance. Concentrations ranging from 0.025% to 1.5% of boric acid, Calcofluor White Stain, Fluorescent Brightener 28 - FB 28 and Umbeliferone, in combination with AgMNPV isolates and products based on *Bacillus thuringiensis* (Dipel®, Xentari® and Agree®) were incorporated into the artificial diet. The treatments were offered to *A. gemmatalis* caterpillars susceptible and resistant to the protein Cry1Ac. The data indicated the response of the optical brightener Fluorescent Brightener 28 at a concentration of 0.1%, which, when mixed with bioinsecticides, caused a mortality increase (synergism) in the resistant population of *A. gemmatalis*. The results of this study, in addition to being an alternative to make *A. gemmatalis* control products more effective and reduce production costs, can also pave the way for new research and the discovery of new substances with synergistic action, which allows the companies to improve the quality of their products. Finally, the genetic structure and diversity of *A. gemmatalis* from different soy producing regions in Brazil was evaluated using microsatellite markers. A total of 134 alleles were analyzed in 155 sampled individuals. The observed global heterozygosity (H_o) was less than the average global expected heterozygosity (H_e), which indicates deviation in the proportions of the Hardy-Weinberg equilibrium for all sampled populations. Most of the genetic variation was found within the populations and the genetic differentiation index (F_{ST}), was moderate among them. The correlation between geographical and genetic distances was negative, but not significant. Positive and significant values of inbreeding coefficient (F_{IS}) were found for most populations. There was no recent bottleneck effect in the five sampled populations. Bayesian analysis of genetic clustering, Neighbor-Net and PCoA indicated the formation of two and four genetic groups, respectively. In the Neighbor-Net analysis a cluster was formed by the populations of Bahia (LemBA) and Mato Grosso (NsjMT) and the second cluster composed of populations of Goiás (MoGO), Londrina (LonPR) and Rio Grande do Sul (CaRS). For the principal coordinate analysis (PCoA) the first cluster was formed by LemBA; the second cluster formed by NsjMT; the third cluster formed by MoGO and LonPR; and a fourth cluster formed by CaRS. The populations are not structured, indicating gene flow among them. These results enrich the microsatellite library with the construction and validation of nine primers for *A. gemmatalis*, and also contribute to the regional management of the species by bringing data on gene flow rates among

populations, since the efficiency of Bt soybeans it depends on the dispersion rate of susceptible alleles between the refuge area and transgenic fields. With an increase in soy cultivated area and other host crops, genetically modified, these studies aim to contribute to the integrated management of *A. gemmatilis*.

Keywords: Velvetbean caterpillar 1. Optical brighteners 2. Cry1Ac protein 3. Population genetics 4. Resistance management 5.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 3

Figura 1. Localização das cinco populações de *Anticarsia gemmatalis* amostradas em regiões produtoras de soja no Brasil.....76

Figura 2. Curva de acumulação genotípica para nove *loci* microssatélite aplicados a cinco populações de *Anticarsia gemmatalis*. A formação de um platô na curva mostra a eficiência dos marcadores utilizados em discriminar os genótipos multilocus únicos que compõem a amostragem.....83

Figura 3. Valores de Delta *K* (ΔK) estimados pelo *Structure Harvester* para as análises de agrupamentos Bayesiano (*Structure*) de populações de *Anticarsia gemmatalis* em cinco estados do Brasil.....91

Figura 4. Estrutura genética e relações filogenéticas de cinco populações de *Anticarsia gemmatalis*, estimadas a partir de nove *loci* SSR. **A)** Análise de agrupamento Bayesiano, realizada pelo software *Structure*, mostrando o bar plot de $K = 2$, designado pelo método de Evanno ($\Delta K = 495.510998$) como número ótimo de K agrupamentos para a amostragem, e o bar plot de $K = 4$, designado pelo método de Evanno ($\Delta K = 17.007028$) como segundo melhor K . **B)** Neighbor-Net, inferida pelo software *SplitsTree*, mostrando as relações filogenéticas entre cinco populações de *Anticarsia gemmatalis*, a partir da distância de Prevosti. Cores de fundo codificadas de acordo com os dois grupos genéticos designados pelo software *Structure*.....92

Figura 5. Análise de Coordenadas Principais (PCoA), inferida a partir da distância de Prevosti para cinco populações de *Anticarsia gemmatalis*.....94

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Concentração de vírus AgMNP e dos produtos Dipel®, Xentari® e Agree® utilizados nas populações de *Anticarsia gemmatalis* resistente e suscetível a proteína Cry1Ac.....76

Tabela 2. Relação de produtos com potencial sinergista utilizados em combinação com o vírus AgMNPV e os produtos Dipel®, Xentari® e Agree®.....53

Tabela 3. Efeito de agentes químicos adicionados a AgMNPV na mortalidade de lagartas de 3° instar de *Anticarsia gemmatalis* suscetível e resistente à proteína Cry1Ac.....56

Tabela 4. Efeito de agentes químicos adicionados ao bioinseticida Dipel® na mortalidade de lagartas de 3° instar de *Anticarsia gemmatalis* suscetível e resistente à proteína Cry1Ac58

Tabela 5. Efeito de agentes químicos adicionados ao bioinseticida Xentari® na mortalidade de lagartas de 3° instar de *Anticarsia gemmatalis* suscetível e resistente à proteína Cry1Ac.....59

Tabela 6. Efeito de agentes químicos adicionados ao bioinseticida Agree® na mortalidade de lagartas de 3° instar de *Anticarsia gemmatalis* suscetível e resistente à proteína Cry1Ac60

Capítulo 2

Tabela 1. Localização, código e tamanho amostral (n) de cinco populações de *Anticarsia gemmatalis*.....75

Tabela 2. Lista de primers microssatélites utilizados para estimativa de parâmetros genético-populacionais de *Anticarsia gemmatalis*, com temperatura de anelamento (T_m), comprimento dos fragmentos gerados em pares de base e conteúdo de informação polimórfica.....79

Tabela 3. Parâmetros intrapopulacionais de diversidade genética de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , estimados a partir de nove <i>loci</i> de SSR.....	84
Tabela 4. Frequências de alelos nulos para nove <i>loci</i> de SSR em cinco populações de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , estimadas pelo software <i>FreeNA</i>	87
Tabela 5. Análise de variância molecular estimada a partir de nove <i>loci</i> SSR, para cinco populações de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	88
Tabela 6. Distâncias geográficas (Km) e genética (F_{ST}) par a par, estimadas a partir de nove <i>loci</i> SSR para cinco populações de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	89
Tabela 7. Taxas médias de fluxo gênico contemporâneo entre cinco populações de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , estimadas a partir de nove <i>loci</i> SSR, pelo software <i>BayesAss</i> . A proporção de não migrantes se encontra na diagonal em negrito.....	89
Tabela 8. <i>P</i> -valores do teste de Wilcoxon, para eventos de gargalo genético, estimados pelo software <i>Bottleneck</i> , a partir de nove <i>loci</i> SSR em cinco populações de <i>Anticarsia gemmatalis</i> ...	90

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA.....	19
1.1 INTRODUÇÃO GERAL.....	19
1.2 OBJETIVOS.....	21
1.2.1 Objetivo geral.....	21
1.2.2 Objetivos específicos.....	21
1.3 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
1.3.1 Suscetibilidade de <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae) a inseticidas e bioinseticidas.....	23
1.3.2 Mecanismos de resistência de insetos a inseticidas e bioinseticidas.....	24
1.3.3 Controle de lagartas desfolhadoras.....	25
1.3.3.1 Controle químico.....	25
1.3.3.2 Controle microbiano.....	26
1.3.3.2.1 Resistência ao vírus de poliedrose nuclear (NPVs).....	27
1.3.3.2.2 Resistência a <i>Bacillus thuringiensis</i>	28
1.3.4 Monitoramento e alternativas para o manejo de resistência de lepidópteros.....	30
1.3.4.1 Uso de marcadores moleculares no estudo de diversidade genética.....	31
1.3.4.1.1 Microsatélites no estudo de diversidade genética de populações e relação com a resistência de insetos.....	32
1.4 REFERÊNCIAS.....	34
 CAPÍTULO 2: ATIVIDADE DE BIOINSETICIDAS COMBINADOS COM AGENTES QUÍMICOS COM POTENCIAL SINERGISTA SOBRE POPULAÇÕES DE <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner, 1818 (LEPIDOPTERA: EREBIDAE) SUSCETÍVEL E RESISTENTE Á PROTEÍNA Cry1Ac.....	 46
2.1 RESUMO.....	46
ABSTRACT.....	47
2.2 INTRODUÇÃO.....	48
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.3.1 Colônia de <i>A. gemmatalis</i>	50
2.3.2 Bioinseticidas.....	51
2.3.3 Produtos com potencial sinergista.....	51

2.3.4 Bioensaios com <i>A. gemmatalis</i> multiple nucleopolyhedrosis (AgMNPV) e produtos comerciais de <i>Bacillus thuringiensis</i> combinados a agentes químicos com potencial sinergista.....	52
2.3.5 Análise estatística.....	53
2.4 RESULTADOS	54
2.4.1 Efeito da adição de branqueadores ópticos a AgMNPV na mortalidade de <i>A. gemmatalis</i> suscetível e resistente à proteína Cry1Ac.....	54
2.4.2 Efeito da adição de branqueadores ópticos a bioinseticidas na mortalidade de <i>A. gemmatalis</i> suscetível e resistente à proteína Cry1Ac.....	56
2.5 DISCUSSÃO.....	60
2.6 CONCLUSÃO.....	62
2.7 REFERÊNCIAS.....	63

CAPÍTULO 3: DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner, 1818 (LEPIDOPTERA: EREBIDAE) PROVENIENTES DE REGIÕES PRODUTORAS DE SOJA NO BRASIL.....	70
3.1 RESUMO.....	70
ABSTRACT	71
3.2 INTRODUÇÃO.....	72
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	74
3.3.1 Amostragem.....	74
3.3.2 Prospecção <i>in silico</i> e desenho dos primers microssatélites.....	75
3.3.3 Extração e quantificação do DNA.....	76
3.3.4 Amplificação e eletroforese capilar.....	76
3.3.5 Análise estatística.....	79
3.3.5.1 Diversidade e estrutura genética de populações.....	79
3.3.5.2 Análise demográfica e fluxo gênico.....	81
3.4 RESULTADOS.....	82
3.4.1 Diversidade e estrutura genética.....	82
3.5 DISCUSSÃO.....	92
3.5.1 Diversidade genética em <i>Anticarsia gemmatalis</i>	92
3.5.2 Estrutura genética de populações em <i>Anticarsia gemmatalis</i>	95
3.6 CONCLUSÃO.....	98

3.7 REFERÊNCIAS.....	100
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, há décadas, apresenta crescimento em área e produção e esta expansão mundial é resultado da estruturação de um sólido mercado internacional relacionado com o comércio de produtos do complexo agroindustrial da soja, o que consolidou a oleaginosa como importante fonte de proteína (HIRAKURI; LAZZAROTO, 2014). Com extensas áreas cultivadas, essa cultura está exposta ao ataque de insetos-praga que podem causar danos no estágio reprodutivo e vegetativo da planta. As lagartas desfolhadoras destacam-se por atacar a cultura e causar níveis variáveis de desfolha, comprometendo sua produtividade devido à redução da área foliar fotossinteticamente ativa (MOSCARDI et al., 2012).

Entre as principais lagartas desfolhadoras que causam prejuízo na cultura estão: *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidæ), *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidæ) e espécies do gênero *Spodoptera*. *Anticarsia gemmatilis* é comumente encontrada em lavouras de soja e ocorre no continente americano, desde as regiões da Argentina (39° S) até o sudeste e Estados do Golfo do México nos Estados Unidos (48° N) (SOSA-GÓMEZ, 2004). Uma das alternativas para diminuir as aplicações de inseticidas químicos, principal medida de controle até 2013, foi a introdução da soja transgênica, que expressa o gene sintético Cry1Ac, oriundo da bactéria *Bacillus thuringiensis*, no mercado brasileiro (RAHMAN et al., 2007). A lagarta falsa-medideira *C. includens* que, até o final da década de 90, era considerada uma praga secundária (MOSCARDI, 1993), na safra de 2002/2003 teve seus primeiros surtos populacionais e passou a ser uma das pragas mais importantes que atacam a oleaginosa devido sua abundância e dificuldade de controle (YANO et al., 2015).

O controle químico é a ferramenta mais utilizada no manejo de pragas (MARTINS & TOMQUELSKI, 2015), entretanto, aplicações constantes de agrotóxicos afetam o equilíbrio do agroecossistema por eliminar inimigos naturais (BUENO et al., 2012), além de aumentar a pressão de seleção de populações de insetos resistentes (SOSA-GÓMEZ; OMOTO, 2012). Assim, falhas podem estar associadas à tecnologia de aplicação inapropriadas e/ou menor suscetibilidade ou resistência de pragas pela pressão de seleção imposta por poucas táticas de manejo em uma área de soja tão

extensa. Lagartas desfolhadoras podem tornar-se resistentes não somente pela pressão de seleção exercida por inseticidas com mesmo modo de ação, mas também por características evolutivas, presentes em todos organismos vivos, que permite os insetos estarem em constante adaptação ao ambiente e assim serem selecionados para resistir aos inseticidas mais frequentemente utilizados (PERINI, 2018).

Na literatura, tem sido mencionada a resistência a diversos inseticidas, tais como piretroides, organofosforados e carbamatos (SOSA-GÓMEZ; OMOTO, 2012; DURIGAN et al., 2017). Mesmo com a grande variedade de inseticidas disponíveis no mercado, observa-se em lavouras de soja baixa eficiência no controle de pragas (MARTINS; TOMQUELSKI, 2015). O uso indiscriminado de produtos não seletivos e de amplo espectro pode contaminar o solo e diminuir a incidência de inimigos naturais. Casos de falhas de controle em lepidópteros em outras grandes culturas como o algodão e o milho ocorrem em ritmo acelerado, como é o caso da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (DIEZ-RODRÍGUEZ & OMOTO, 2001; BUSATO et al., 2006; MARTINELLI & OMOTO, 2006).

Implementações de estratégias para evitar a seleção de insetos resistentes e também a investigação da diversidade genética destas pragas nas regiões produtoras de soja são fundamentais para definir as bases do manejo de resistência de insetos no Brasil. A existência de diversidade genética nas populações de insetos com relação a quaisquer características fisiológicas e/ou comportamentais, que possibilitem os indivíduos superar as medidas de controle, implicam em um processo inevitável de seleção de pragas mais adaptadas e difíceis de serem controladas (GOULD, 1988 ab, 1991).

O uso de substâncias com ação sinérgica em aplicação simultânea com inseticidas tem sido uma alternativa na tentativa de compreender os processos envolvidos na resistência (CASIDA, 1970). Além disso, esta combinação do inseticida a um sinergista pode diminuir efeitos de contaminação do ambiente e preservar insetos benéficos que contribuem para o controle natural dessas pragas (RAFFA & PRIESTER, 1985).

Os sinergistas em mistura com inseticidas tem especial importância na determinação das enzimas envolvidas nos processos de detoxificação pelos insetos. Por exemplo, falhas no controle de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) com o uso de piretroides têm sido relatadas desde sua detecção no Brasil,

em 2013, estudos mostram que, especificamente, em *H. armigera*, a resistência aos piretroides foi associada ao aumento da desintoxicação de inseticidas pelas enzimas monooxigenase do citocromo P450, sendo considerado o principal mecanismo de resistência genético aos piretroides (DURIGAN et al., 2017). Visando determinar as causas da resistência deste grupo químico, populações de *H. armigera* que foram tratadas com deltametrina ou fenvalerato e o sinergista butóxido de piperonila (PBO) apresentaram 100% de mortalidade, o que indica a alta frequência do gene da enzima quimérica P450 CYP337B3 nestas espécies que podem ser consideradas tolerantes a inseticidas piretroides, sugerindo que estes produtos não devem ser recomendados no Brasil (DURIGAN et al., 2017).

Portanto, tornam-se necessários estudos com inseticidas químicos e biológicos, para evitar a seleção de insetos resistentes, e também a investigação da diversidade genética nas regiões produtoras de soja para a implementação de um manejo de resistência de insetos no Brasil, visto que a caracterização precisa de populações geográficas permite inferir as taxas de fluxo gênico, as quais têm importância nos estudos de resistência (SOSA-GÓMEZ et al., 2004).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a diversidade genética e a suscetibilidade de *A. gemmatilis* a inseticidas biológicos em aplicações conjuntas ou sequenciais com produtos que tem ação sinérgica, com a finalidade de aprimorar a eficiência dos bioinseticidas e o manejo da resistência destas espécies.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Reunir a literatura de *A. gemmatilis*.
- Quantificar a mortalidade larval de *A. gemmatilis* suscetíveis e resistentes a Cry1Ac expostas a concentrações de diferentes bioinseticidas isolados e, em aplicação simultânea ou sequencial com produtos sinergistas.
- Desenvolvimento de uma biblioteca enriquecida de microssatélites para *A.*

gemmatalis, construção e validação dos primers.

- Verificar a variabilidade genética em cinco populações de *A. gemmatalis* em diferentes regiões produtoras de soja no Brasil.
 - Estimar as taxas de fluxo gênico entre as cinco populações de *A. gemmatalis* que foram amostradas.

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae) a inseticidas e bioinseticidas

A lagarta-da-soja, *A. gemmatalis*, é uma das pragas-chave mais importantes na cultura da soja, com ampla distribuição, esta espécie causa perdas na produção em todas as áreas onde a cultura está presente (BEL et al., 2017). Sua ocorrência é, desde o início do desenvolvimento até o final da cultura, sendo maior incidência no período vegetativo permanecendo até o final da floração (SAVIO & PINOTTI, 2008). É considerada a principal praga desfolhadora da soja nos EUA, México, Colômbia, Venezuela, Brasil e Argentina (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

Assim, esta espécie pode apresentar até seis gerações ou mais no ano, dependendo do local, e está presente, principalmente, em regiões mais quentes, resultando em uma maior exposição aos métodos de controle aumentando o risco de evolução de resistência, caso não sejam implementadas estratégias para o seu manejo. A introdução da soja Bt, que expressa a proteína Cry1Ac, no mercado brasileiro foi uma alternativa importante para diminuir as aplicações de inseticidas sintéticos (RAHMAN et al., 2007).

Entretanto, diante a tecnologia Bt, *A. gemmatalis* pode ser considerada uma das espécies com risco de seleção de populações resistentes a Cry1Ac, uma vez que populações se tornam resistentes em condições de laboratório após seleção através de quatro gerações (SOSA-GOMEZ & MIRANDA, 2011). As principais ferramentas utilizadas para retardar o aumento da frequência de alelos de resistência nas áreas cultivadas com plantas que expressam proteínas da bactéria *B. thuringiensis* são a piramidação de genes que diz respeito ao acréscimo de genes de Bt na planta (GOULD, 1998; MACRAE et al., 2005); alta dose da proteína Bt que tem como premissa garantir que a concentração de uma determinada proteína expressa na planta geneticamente modificada possibilite a mortalidade dos descendentes resultantes do cruzamento dos indivíduos resistentes, provenientes da área que está a cultura Bt, com indivíduos suscetíveis, provenientes da área de refúgio (OMOTO & BERNARDI, 2015); e o refúgio que consiste no plantio de uma variedade sem a tecnologia Bt, de ciclo vegetativo similar ao da área cultivada com plantas Bt; ou seja,

é a área onde a praga não é exposta à pressão de seleção da proteína inseticida presente no campo Bt, na qual pode sobreviver e acasalar com os indivíduos sobreviventes da área de cultivo Bt com o objetivo de disseminar alelos suscetivos (ANDOW, 2008).

1.3.2 Mecanismos de resistência de insetos a inseticidas e bioinseticidas

A resistência pode ser comportamental e genética, transmitida de pais para filhos, quando insetos de uma geração adquirem mecanismos capazes de impedir que os inseticidas atuem no processo de intoxicação (ALVES, 1998). Assim a resistência relacionada aos produtos que são utilizados para controlar pragas e o modo de utilização destes, é afetada por fatores genéticos, relacionados a genética da praga alvo, bioecológicos, que estão associados a biologia e ecologia da praga alvo, e operacionais, que são todos os fatores manipulados pelo homem, (GEORGHIOU & TAYLOR, 1977; ROUSH & MCKENZIE, 1987).

Todo o processo evolutivo dos insetos ao longo de milhões de anos (MISOF et al., 2014), associado ao ambiente em que viveram, contribuiu para a evolução dos fatores genéticos que os tornam resistentes a certos inseticidas (PERINI, 2018). Assim, a evolução de populações resistentes pode ocorrer por alterações do comportamento do inseto, por redução da penetração cuticular, pelo aumento da expressão de enzimas metabólicas, por aumento da capacidade de expressão de genes ou por mutação alterando seus sítios de ação (MUTERO et al., 1994; JOUBEN & HECKEL, 2016).

A pressão de seleção, com a utilização de inseticidas que apresentam o mesmo modo de ação, e o uso de tecnologias sem as práticas de manejo de resistência recomendadas, podem conduzir a seleção de fenótipos resistentes (SOSA-GÓMEZ; OMOTO, 2012). O conhecimento das características genéticas e de fluxo gênico das espécies agrícolas é um aspecto importante no controle de pragas. Por meio de ferramentas moleculares, é possível sequenciar genes e caracterizar a ocorrência de alterações mutacionais, que podem fornecer importantes informações sobre processos evolutivos e de diferenciação de populações resistentes a inseticidas (MARTINS et al., 2005).

No controle químico, assim como no biológico, a resistência em uma

determinada praga-alvo pode ocorrer de forma cruzada, quando insetos são resistentes a dois ou mais produtos pertencentes a um mesmo mecanismo de ação, de grupos químicos diferentes, ou múltipla, que ocorre quando um indivíduo possui um ou mais mecanismos que conferem resistência a produtos com mecanismo de ação diferentes (CHRISTOFFOLETI & LÓPEZ-OVEJERO, 2008). Identificar estes mecanismos, como a produção de esterases que podem conferir resistência a organofosforados, por exemplo (OMOTO & SOSA-GÓMEZ, 2012) ou outras enzimas que estão envolvidas neste processo, resulta em informações sobre qual produto utilizar, quais devem ser evitados, se é recomendado optar por misturas e qual a melhor forma de controle.

Em relação a plantas geneticamente modificadas e a inseticidas biológicos, a resistência à bactéria *B. thuringiensis* tem origem genética. As mutações genéticas podem estar presentes, ou seja, o gene ou genes que conferem resistência podem estar numa população de insetos, mesmo antes da introdução de um novo agente de controle (FFRENCH-CONSTANT, 2007). No Brasil, a evolução da resistência foi reportada em *S. frugiperda* a tecnologias de milho Bt com as proteínas Cry1F e Cry1Ab (FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2016).

1.3.3 Controle de Lagartas Desfolhadoras

1.3.3.1 Controle Químico

Durante o século passado, um grande número de inseticidas foi introduzido no mercado. Curiosamente, em cada década, foi realizada a introdução de pelo menos uma classe química nova (JEANGUENAT, 2012). O resultado foi que, até meados da década de 70, o controle químico foi adotado como única alternativa para controlar pragas e doenças no campo. Entretanto, os produtos utilizados eram de amplo espectro de ação, sendo altamente tóxicos aos insetos benéficos, que controlavam as pragas naturalmente, e ao homem (GAZZONI, 1994).

Com o incremento da área cultivada e uma maior diversidade de organismos se tornando pragas-chave da cultura da soja programas de manejo de monitoramento introduziram a utilização de outras técnicas de controle e possibilitaram o aumento de inimigos naturais, reduzindo o uso de químicos na lavoura

por décadas (BUENO et al., 2012). Porém, com a introdução de pragas, antes desconhecidas no Brasil, como *H. armigera*, a falta de informação sobre o inseto e produtos registrados para o controle ocasionou o acréscimo do uso exclusivo de agrotóxicos, levando novamente ao desequilíbrio (KUSS et al., 2016).

Apesar dos investimentos da indústria para sintetizar novas moléculas com potencial de controle de espécies de insetos-praga, apenas alguns grupos químicos de inseticidas apresentaram importância comercial a partir da década de 90, que são os organofosforados, carbamatos, piretroides e os neonicotinoides, que têm como via de interferência principal a transmissão colinérgica do sistema nervoso central do inseto (NAUEM, 2006). Posteriormente, o grupo das espinosinas apresentou o primeiro produto comercial em 1997, o spinosad (SALGADO, 1998) e, em 2007, o spinetoram (SPARKS et al., 2008). Considerando os últimos desenvolvimentos em química de inseticidas, publicados por cientistas das empresas Nihon Nohyaku no Japão (TONISHI et al., 1999), Bayer na Alemanha (KONZE et al., 2004) e DuPont nos Estados Unidos (LAHM et al., 2005), foram descobertas novas moléculas inseticidas, as diamidas que atuam em receptores de rianodina (RyRs) dos insetos, e que foi inaugurado pelas diamidas do ácido ftálico que inclui a flubendiamida (NAUEN 2006; TOHNISHI et al., 2005), e as diamidas antranílicas que abrange o composto clorantraniliprole (LAHM, 2005; 2009). Esse grupo se destaca por ser praticamente não-tóxicas para vertebrados terrestres e aquáticos, e, quando utilizadas de acordo com as recomendações de bula, os insetos benéficos também são pouco afetados (POZEBON, 2021).

1.3.3.2 Controle Microbiano

O controle biológico consiste em controlar pragas agrícolas e outros insetos transmissores de doenças com uso de uma ou mais espécies de inimigos naturais que podem ser outros insetos benéficos, predadores, parasitoides e microrganismos, como fungos, vírus e bactérias. Assim, o controle biológico é a base do manejo integrado de pragas (MIP) (BUENO et al., 2012) que, além de diminuir o uso de agrotóxicos, se bem aplicado e monitorado, ele pode promover maior sustentabilidade ambiental e biodiversidade no agroecossistema, impedindo que os insetos-praga atinjam níveis capazes de causar dano econômico, tendo como principais vantagens,

não deixar resíduo no ambiente, ser atóxico para o homem e ser específico, preservando os inimigos naturais (HERZOG & TOOD, 1980).

Uma das vertentes é o controle microbiano, realizado por entomopatógenos (fungos, bactérias, vírus, protozoários e microsporídios) (BUENO et al., 2012). Dentre as principais vantagens do uso dos microrganismos, podemos citar a eficiência de controle, assim como a facilidade de multiplicação, dispersão e produção em laboratório, bem como sua aplicação no campo (SIMONATO et al., 2013).

Em testes com *A. gemmatilis* serão utilizados os bioinseticidas a base de *B. thuringiensis* e o vírus de poliedrose nuclear AgMNPV, que foram desenvolvidos a partir de microrganismos que tem potencial patogênicos sobre insetos-pragas. O uso dessa prática no Brasil com parasitoides, vírus, bactérias e fungos entomopatogênicos têm demonstrado sucesso no controle de pragas da soja, como é caso de baculovírus para *A. gemmatilis* e *B. thuringiensis* para lagartas desfolhadoras. Porém o surgimento de resistência de pragas aos entomopatógenos também pode ocorrer assim como ocorre com uso o excessivo de agrotóxicos (FUXA et al. 1993; ABOT et al. 1996; ASSER-KAISER et al., 2011; GEBHARDT et al., 2014; REICHELDERFER & BENTON, 1974; FUXA et al., 1988; MILKS & MYERS 2003).

1.3.3.2.1 Resistência ao Vírus de Poliedrose Nuclear (NPVs)

Os vírus de poliedrose nuclear (NPV) são excelentes candidatos a inseticidas microbianos (SOSA-GÓMEZ, 2017). Destacam-se por sua virulência e especificidade em relação ao hospedeiro, oferecendo, assim, segurança a organismos não alvo, vertebrados e ao meio ambiente (MOSCARDI, 1999).

O VPN de *A. gemmatilis* (AgMNPV), identificado pela primeira vez no Brasil na década de 70 e isolado de *A. gemmatilis* mortas (ALLEN; KNEILL, 1977), foi o primeiro caso da utilização de um vírus entomopatogênico no país de forma aplicada (BUENO et al., 2012). O início do programa para controle da lagarta-da-soja com AgMNPV aconteceu na safra de 1982/1983 e, na safra de 1989/1990, a área tratada chegou a cerca de um milhão de hectares (MOSCARDI; SOSA-GÓMEZ, 1992, 1993) atingindo, aproximadamente, dois milhões de hectares em 2003/2004, cerca de 10% da área cultivada com soja em todo o país (MOSCARDI, 2007; MOSCARDI et al., 2011).

Mesmo com a eficácia do programa pelo controle de *A. gemmatalis* e a facilidade de aplicação (MOSCARDI, 1986), nos últimos anos, a área com baculovírus reduziu. Foi aplicado, anualmente, em apenas 100-200 mil hectares de soja, o que representa uma redução de baculovírus significativa da área total. Além da prevalência de *C. includens* nas lavouras de soja, a introdução da soja Bt que controla eficientemente a lagarta-da-soja e a falsa-medideira, contribuíram para a diminuição da área aplicada (SOSA-GÓMEZ, 2017). Bioinseticidas virais podem ser uma valiosa alternativa que pode ser adicionado ao manejo integrado (CHIKHALYA et al., 2013). Como exemplo, os inseticidas à base de baculovírus podem ser uma escolha promissora para controlar pragas em áreas de refúgio, em campos com soja Bt, como parte de um programa de manejo de resistência para evitar a seleção de fenótipos resistentes à proteína Cry1Ac (SOSA-GÓMEZ, 2017).

No Brasil, o baculovírus de *C. includens* (ChinMNPV), Chrysogen®, foi registrado para o manejo da lagarta-falsa-medideira. Um estudo recente aponta que as populações brasileiras de *C. includens* provenientes do campo eram suscetíveis ao ChinNPV à população suscetível de referência (MURARO et al., 2018). No entanto, o processo de resistência envolve dois organismos, o hospedeiro e o patógeno que apresentam a capacidade de multiplicação. Assim um vírus que sofre algum tipo de alteração pode ter um acréscimo de sua virulência pelo processo de seleção repetida, porém, resultando em baixa virulência para seu hospedeiro (SOSA-GÓMEZ; OMOTO, 2012) e, da mesma forma que inseticidas sintéticos ou toxinas Bt, os insetos também são capazes de desenvolver resistência a vírus entomopatogênicos, conforme relatado em uma população de *A. gemmatalis* em laboratório ao AgMNPV (FUXA et al. 1993, ABOT et al. 1996).

1.3.3.2.2 Resistência a *Bacillus thuringiensis*

A bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* (Bt) está entre uma das alternativas utilizadas no controle de lepidópteros como *A. gemmatalis* e *C. includens*. Sua principal característica é que, durante a esporulação, ocorre a produção de um ou mais corpos cristalinos de natureza proteica, que são tóxicas para diversos invertebrados, especialmente larvas de insetos. Essas proteínas são chamadas Cry e são a base dos inseticidas biológicos mais utilizados no mundo, atualmente

(TABASHNIK et al., 2010). O desenvolvimento de novos produtos, como por exemplo Agree®, Dipel® e Xentari®, foi possível devido estas proteínas serem codificadas por genes Cry, o que facilita a manipulação de diferentes genes em processos biotecnológicos (CAPALBO et al., 2005). Esses bioinseticidas tem atraído atenção de pesquisadores em todo mundo devido a sua atividade inseticida. A eficácia e especificidade das cepas de Bt e suas toxinas no controle de insetos praga, favoreceu a formulação de bioinseticidas à base deste patógeno e, desde o primeiro produto lançado na França em 1938, mais de 300 produtos à base de Bt são responsáveis por 53% do mercado mundial de bioinseticidas, gerando um faturamento anual de 210 milhões de dólares (CAB INTERNACIONAL CENTRE, 2010).

A maioria dos produtos, são baseados em preparações de esporos-cristal derivados de algumas estirpes de tipo selvagem, tais como *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 e HD-73 que produz Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa; ou *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD-137 que produz Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca e Cry1Da (SOBERÓN et al., 2009). Quando ingeridas por um inseto suscetível, as proteínas Cry são solubilizadas no intestino médio do inseto e, em seguida, processadas por proteases específicas. Os produtos ativos das proteínas Cry resultantes de todos esses processos ligam-se de maneira irreversível a receptores da membrana das células epiteliais do intestino, ocasionando a formação de poros inespecíficos ou canais iônicos que alteram a permeabilidade das células provocando lise osmótica e a ruptura da integridade intestinal, e por fim a morte do inseto (CAPALBO et al., 2005).

Ainda que formulações à base de *B. thuringiensis* se mostre, teoricamente, eficazes, aplicações em campo têm evidenciado efeito oposto, com menor eficácia e persistência de sua atividade bioinseticida, o que resulta em aplicações recorrentes, dependendo do produto e do inseto alvo (CAPALBO et al., 2005). Trabalhos realizados em laboratório, com populações suscetível e resistente de *A. gemmatilis*, demonstraram, inclusive, que os bioinseticidas Dipel®, Xentari® e Agree® apresentam variações em relação à mortalidade do inseto (GHOLMIE et al., 2018). Portanto, estudos que aperfeiçoem e, conseqüentemente, aumentem a eficácia de bioinseticidas, se fazem impreteríveis para o desenvolvimento de estratégias de manejo de resistência dentro do manejo integrado de pragas na cultura da soja.

1.3.4 Monitoramento e alternativas para o manejo de resistência de lepidópteros

Para iniciar um bom programa de manejo de resistência é necessário o desenvolvimento de dados da linha básica de suscetibilidade ou linhas discriminatórias que representam o primeiro passo para detectar mudanças na suscetibilidade, que podem resultar da exposição repetida e prolongada ao inseticida. As linhas discriminatórias são determinadas após a exposição das populações de campo aos inseticidas, neste caso, há a possibilidade da presença de indivíduos com alelos de resistências (YANO, 2012).

Alterações na suscetibilidade de populações praga, antes que a frequência crítica da resistência seja atingida, torna o monitoramento de pragas uma ferramenta fundamental para orientar a tomada de decisão de controle. O resultado é a implementação de estratégias proativas para gerenciar e manter a suscetibilidade, retardar a evolução da resistência e manter a vida útil dos inseticidas (ROUSH & MILLER, 1986). Para French-Constant et al. (1990), a resistência a inseticidas deve ser detectada e monitorada mediante à caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de populações de campo obtidas por meio de ensaios dose-resposta, por exemplo. A caracterização das curvas de suscetibilidade em diversas populações geográficas permite comparações através do tempo das possíveis alterações nos níveis de suscetibilidade, sem a interferência da variabilidade geográfica.

Além da rotação de produtos químicos com modos de ação diferentes para o controle de pragas e aplicação na época correta com condições climáticas favoráveis, o uso de sinergistas em misturas com inseticidas pode ser uma alternativa para estudar estas interações na tentativa de aumentar a toxicidade dos químicos já disponíveis no mercado. Uma vez que, a quantidade necessária de inseticidas para o controle de lepidópteros e outros insetos, é minimizada pela ação destes produtos (CASIDA, 1970), podendo ainda colaborar para diminuir os efeitos de contaminação do ambiente e preservar insetos benéficos que podem contribuir para o controle natural dessas pragas (RAFFA & PRIESTER, 1985). Os sinergistas em mistura com inseticidas e bioinseticidas (vírus e bactérias), têm importância na determinação dos mecanismos envolvidos no processo de detoxificação dos inseticidas, e a identificação desses mecanismos podem contribuir para a identificação de espécies resistentes ou na definição de estratégias para a quebra dessa resistência .

O uso de substâncias que sinergizam com entomopatógenos é diferente dos inseticidas químicos, porque o fenômeno de resistência a agentes biológicos é mais complexo por envolver dois organismos, o hospedeiro e seu patógeno que têm capacidade de multiplicação (replicar, no caso dos vírus) e, portanto, ambos com capacidade de sofrer alterações genéticas. É possível que os principais mecanismos de defesa contra a infecção das partículas virais envolvam as células do intestino médio, as quais intervêm nas etapas iniciais do processo antes da infecção sistêmica (BRIESE, 1986).

Os métodos genotípicos também podem ser uma ferramenta importante para o manejo de resistência. Conhecimentos relacionados à diversidade genética entre populações da praga têm sido reconhecidos como informações de grande importância para o manejo integrado de pragas. Dependendo da taxa de dispersão e do genótipo dos indivíduos imigrantes, pode ocorrer o aumento da frequência dos alelos de resistência ou a diluição destes alelos em uma população de insetos (CAPRIO & TABASHNIK, 1992). No Brasil, pouco se sabe sobre a separação das populações geográficas de *A. gemmatilis*. A soja é a principal cultura hospedeira, porém, outros hospedeiros alternativos e/ou nativos estão disponíveis durante o ano todo e é possível que as populações de lagartas possam se manter nestes locais. Pode ocorrer, também, que parte da população permaneça no local e parte dela seja migratória, como é o caso de *A. gemmatilis*, assim, é possível saber se os genótipos estão distribuídos em uma região específica (SOSA-GÓMEZ, 2004).

1.3.4.1 Uso de marcadores moleculares no estudo de diversidade genética

A diversidade genética constitui o material básico para a evolução das espécies (SOLÉ-CAVA & CUNHA, 2012). Em populações naturais, a ocorrência de mutações e migração, aumentam a diversidade genética. Por outro lado, processos como deriva genética, cruzamentos endogâmicos e seleção natural contribuem para a redução da diversidade genética (COLE, 2003), podendo ter como resultado o aumento da suscetibilidade a diversos fatores bióticos e abióticos, perda de alelos por incompatibilidade, fixação de alelos deletérios e declínio na aptidão ecológica das espécies (AGUIAR et al., 2013).

Os marcadores moleculares têm sido destaque na investigação da

variabilidade genética em populações naturais (FERREIRA, 2013; RODRIGUES, 2014; GODOY et al., 2019) visto que, a partir deles, é possível a discriminação genotípica de forma rápida e precisa, pois permite o estudo da variação genética em nível de DNA (SOUZA, 2015).

A técnica PCR, que surgiu na década de 80, foi o marco de uma revolução nas técnicas de biologia molecular, pois a partir daí, foi possível uma melhor compreensão de processos de especiação, padrões de biogeografia em nível da espécie, bem como a estrutura genética de populações, mapas genéticos, identificação de cultivares e paternidade de híbridos (GÓES, 2019). Os marcadores de DNA mais utilizados para inferir diversidade genética de populações foram o RAPD (*Random Fragment Polymorphic*) que envolve a detecção de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso que consiste na amplificação de DNA genômico em PCR (SOUZA, 2015), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) que são marcadores gerados pela análise de polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado que foram descritos por Vos et al. (1995) (SOUZA, 2015), o SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou microssatélites que serão utilizados neste trabalho (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

1.3.4.1.1 Microssatélites no estudo de diversidade genética de populações e relação com a resistência de insetos

Microssatélites ou sequência simples repetida (*Simple Sequence Repeats* - SSR) são repetições em tandem de um a seis nucleotídeos (OLIVEIRA et al., 2006) encontrados em todos os eucariotos e procariotos estudados (ZANE et al., 2002). São marcadores classificados quanto ao tamanho da sua repetição, sendo denominados mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos, para repetições de um, dois, três, quatro, cinco ou seis pares de bases, respectivamente. Eles também podem ser classificados quanto a estrutura da repetição, sendo designados como perfeitos, quando existe somente um motif de repetição, sem interrupções; imperfeitos, quando existem bases diferentes intercalando a repetição; e compostos, quando mais de duas repetições perfeitas ou imperfeitas estão separadas por no máximo 3pb (WEBER, 1990).

Os microssatélites apresentam características intrínsecas que facilitam sua análise e classificação, como, por exemplo, o seu pequeno tamanho total em torno de

100 a 300pb, incluindo as regiões flangeadoras, o que permite sua amplificação por PCR. Portanto, a análise de microssatélites tornou-se uma ferramenta poderosa para pesquisa em animais (SCHLÖTTERER et al., 1991). Segundo Heywood e Iriondo (2003), os SSR fornecem informações relevantes para a identificação dos processos genéticos que ocorrem nas populações, como padrões de fluxo gênico, geração de vizinhanças genéticas e incidência de deriva genética.

Devido à elevada taxa de mutações dos SSR, estes marcadores são capazes de discriminar diferenças significativas entre populações e genótipos, além de detectar recentes alterações na história evolutiva das espécies (OLIVEIRA et al., 2006). Atualmente, marcadores microssatélites são comumente empregados para a análise da estrutura genética de espécies agrícolas (PINTO et al., 2003 a, b; CHEN; DORN, 2010; CHAPUIS et al., 2011; FONTES et al., 2012; VALLE et al., 2013). Devido à sua natureza co-dominante e alta informatividade, diversos estudos têm utilizado com sucesso estes marcadores na análise de espécies pragas (DOMINGUES et al., 2012; KIRK et al., 2013; PAVINATO et al., 2013). Portanto, conhecer a composição genética de espécies de importância agronômica, como a estrutura populacional e o fluxo gênico, são informações relevantes e que servem de base para os estudos de manejo integrado de pragas (BUSATO et al., 2004; SOSA-GÓMEZ et al., 2004; DOMINGUES et al., 2012).

1.4 REFERÊNCIAS

- ABOT, A.R.; MOSCARDI, F.; FUXA, J. R.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; RICHTER, A. R. Development of resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the united States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. **Biological control**, v.7, p. 126-130, 1996.
- ANDOW, D. A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, Trieste, v. 4, p. 142-199, 2008.
- AGUIAR, R. V.; CANSIAN, R. L.; KUBIAK, G. B.; SLAVIERO, L.B.; TOMAZONI, T. A.; BUDKE, J.C.; MOSSI, A. J. Variabilidade genética de *Eugenia uniflora* L. em remanescentes florestais em diferentes estádios sucessionais. **Revista Ceres**, v. 60, p. 226-233, 2013.
- ALLEN, G. E.; KNELL, J. D. A. nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatalis*: I. Ultrastructure, replication and pathogenicity. **Florida Entomologist**, v. 60, 233–240, 1977.
- ALVES, S.B. Controle microbiano de insetos. 2 ed. **Piracicaba: Fealq**, v. 1, p. 1163, 1998.
- ASSER-KAISER, S.; RADTKE, P.; EL-SALAMOUNY, S.; WINSTANLEY, D.; JEHL, J. A. Baculovirus resistance in codling moth (*Cydia pomonella* L.) caused by early block of virus replication. **Virology**, v. 410, p. 360–367, 2011.
- BEL, Y.; SHEETS, J. J.; TAN, S. Y.; NARVA, K. E.; ESCRICHE, B. Toxicity and Binding Studies of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac, Cry1F, Cry1C, and Cry2A Proteins in the Soybean Pests *Anticarsia gemmatalis* and *Chrysodeixis (Pseudoplusia) includens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, p. 1-13, 2017.
- BRIESE, D. T. Insect resistance to baculovirus. In: Granados, R. R.; FEDERICI, B. A. (ED.). **The Biology of baculoviruses**, p. 237-263, 1986.
- BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORREA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F.; BUENO, R. C. O. F. Inimigos naturais das pragas da soja. In: HOFFMAN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. Soja: Manejo integrado de insetos e

outros artrópodes-praga. **Brasília: Embrapa**, p. 493-630, 2012.

BUSATO, G. R.; GRUTZMACHER, A.D.; DE OLIVEIRA, A. C.; VIEIRA, E. A.; ZIMMER, P. D.; KOPP, M. M.; BANDEIRA, J. M.; MAGALHÃES, T. R. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 709-716, 2004.

BUSATO, G.R.; GRUTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; GIOLO, F.P.; MARTIN, A.F. Suscetibilidade de lagartas dos biótipos milho e arroz de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas com diferentes modos de ação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, p.1520, 2006.

CAB International Centre. **The 2010 Worldwide Biopesticides Market Summary**. Wallingford: CAB International Centre, p. 40, 2010.

CAPALBO, D. M. F.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M. N.; SUSUZI, M. T. *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 34, 2005.

CAPRIO, M. A.; TABASHINIK, B. E. Gene flow accelerates local adaptation among finite populations: simulating the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 610-620, 1992.

CASIDA, J. E. Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 18, p. 753-772, 1970.

CHAPUIS, M. P.; POPPLE, J. M.; BERTHIER, K.; SIMPSON, S. J.; DEVESON, E.; SPURGIN, P.; STEINBAUER, M. J.; SWORD, G. A. Challenges to assessing connectivity between massive populations of the Australian plague locust. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 278, p. 3152-3160, 2011.

CHEN, M. H.; DORN, S. Cross-amplification of microsatellites from the codling moth *Cydia pomonella* to three other species of the tribe Grapholitini (Lepidoptera: Tortricidae). **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 1034-1037, 2010.

CHIKHALYA, A.; STEPHENS, K. D.; ARCHIE, J. W.; HAAS-STAPLETON, E. J.

Virulence and pathogenesis of the baculovirus *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) in *Pseudoplusia includens* larvae. **Biological Control**, v. 65, p. 101-108, 2013.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P. J. (Coord.). Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. 3.ed. **Piracicaba: HRAC-BR**, p. 3-30, 2008.

COLE, T.C. Genetic variation in rare and common plants. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 34, p. 213-237, 2003.

DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 311-316, 2001.

DOMINGUES, F. A.; SILVA-BRANDÃO, K. L.; ABREU, A. G.; PERERA, O. P.; BLANCO, C. A.; CÔNSOLI, F. L.; OMOTO, C. Genetic Structure and Gene Flow Among Brazilian Populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 105, p. 2136–2146, 2012.

DURIGAN, M. R.; CORRÊA, A. S.; PEREIRA, R. M.; LEITE, N. A.; AMADO, D.; DE SOUSA, D. R.; OMOTO, C. High frequency of CYP337B3 gene associated with control failures of *Helicoverpa amigera* with pyrethroid insecticides in Brazil. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 143, p.73– 80, 2017.

FARIAS, J. R.; ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; SORGATTO, R. J.; FRESIA, P.; SANTOS, A. C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150-158, 2014.

FERREIRA, D. G. Análise genética da espécie Neotropical *Geophagus brasiliensis* (Osteichthyes: Cichilidae). Dissertação (Mestrado), 2013.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3.ed. Brasília: **Eembrapa-Cenargen**, p. 220, 1998.

FFRENCH-CONSTANT, R. H. Which came first: insecticides or resistance? **Trends in Genetics**, v. 23, p. 1-4, 2007.

FFRENCH-CONSTANT, R. H., ROUSH, R. T., MORTLOCK, D., DIVEY, G. P. Isolation of dieldrin resistance from field populations of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 83, p. 733–1737, 1990.

FONTES, F. H. M.; COLOMBO, C. A.; LOURENÇÃO, A. L. Structure of genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) populations in Brazilian crops and locations. **Scientia agricola**, v. 69, p. 47-53, 2012.

FUXA, J. R.; MITCHELL, F. L.; RICHTER, A. R. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to a nuclear polyhedrosis virus in the field and laboratory. **BioControl**, v. 33, p. 55–63, 1988.

FUXA, J. R.; ABOT, A. R.; MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D. R. ; RICHTER, A. R. Selection of *Anticarsia gemmatilis* resistance to nuclear polyhedrosis virus, and susceptibility of field populations to the virus. **Resistance pest Management**, v. 5, p. 40-41, 1993.

GAZZONI, D. L. Manejo de pragas da soja: uma abordagem historica. **Londrina: Embrapa-CNPSo**, Documentos 78, p. 72, 1994.

GEBHARDT, M. M.; EBERLE, K. E.; RADTKE, P.; JEHLE, J. A. Baculovirus resistance in codling moth is virus isolate-dependent and the consequence of a mutation in viral gene pe38. **National Academy of Sciences, USA**. v. 111, p. 15711–15716, 2014.

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Genetic and Biological Influences in the Evolution of Insecticide Resistance. **Journal of economic entomology**, v. 70, p. 319-323, 1977.

GHOLMIE, M. A. R.; LOPES, I. O. N.; SOSA-GOMEZ, D. R. Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatilis* (resistente e suscetível a toxina Cry1Ac) a inseticidas biológicos à base de *Bacillus thuringiensis*. **Congresso Brasileiro de Soja**, 8, p. 201-203, 2018.

GODOY, S.M.; SILVA, J.F.M.; RUAS, P.M.; RITTER, M. R.; DE PAULA, G. B. N.; MAFFEI, E. M. D.; GÓES, B.D.; RUAS, C.F. Multilocus approach reveals a complex evolutionary history of the invasive mile-a-minute plant, *Mikania micrantha* (Asteraceae), in its natural habitat. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 191, p. 188–215, 2019.

GÓES, B. D. Estudos moleculares em *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae) no estado do Paraná. Tese (Doutorado), 2019.

GOULD, F. Evolutionary biology and genetically engineered crops. **Bioscience**, Washington, v. 38, p. 26-33, 1988a.

GOULD, F. Genetic engineering, integrated pest management, and the evolution of pests. **Trend in Biotechnology**, Amsterdam, v. 6, p. 15-19, 1988a.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 701 – 726, 1988b.

GOULD, F. The evolutionary potential of crop pests. **American Scientist**, New Haven, v. 79, p. 496-507, 1991.

HEYWOOD, V. H.; IRIONDO, J. M. Plant conservation: Old problems, new perspectives. **Biological Conservation**, v. 113, p. 321-335, 2003.

HERZOG, D.C.; TODD, J.H. Sampling velvetbean caterpillar on soybean. p. 107-140. In M. Kogan; D.C. Herzog (eds.). **Sampling methods in soybean entomology**, p. 587, 1980.

HIRAKURI, M.H.; LAZZAROTTO, J.J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro [online]. **Londrina: Embrapa Soja**, 14 p. Circular Técnica, n. 126, p. 14, 2014.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. **Londrina: Embrapa Soja-CNPSO**, Circular Técnica, n. 30, p. 70, 2000.

JEANGUENAT, A. The story of a new insecticidal chemistry class: the diamides. **Pest**

Management Science, v. 69, p. 7-14, 2012.

JOUBEN, N.; HECKEL, D. G. Resistance Mechanisms of *Helicoverpa armigera*. **Advances in Insect Control and Resistance Management**, Springer International Publishing Switzerland, p. 241-261, 2016.

KIRK, H., DORN, S., MAZZI, D. Worldwide population genetic structure of the oriental fruit moth (*Grapholita molesta*), a globally invasive pest. **Biomed Central Ecology**, v. 13, p. 1-11, 2013.

KONZE, J.; ANDERSCH, W.; STÜBLER, D.; FISCHER, R. WO 2 004 034 786, 2004.

KUSS, C. C.; ROGGIA, R. C. R. K.; BASSO, C. J.; OLIVEIRA, M. C. N.; PIAS, O. H. C.; ROGGIA, S. Controle de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) em soja com inseticidas químicos e biológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.51, p. 527-536, 2016.

LAHM, G.P.; SELBY, T.P.; FREUDENBERGER, J. H.; STEVENSON, T. M.; MYERS, B. J.; SEBURYAMO, G.; SMITH, B. K.; FLEXNER, L.; CLARK, C. E.; CORDOVA, D. Insecticidal anthranilic diamides: A new class of potent ryanodine receptor activators. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, p. 4898-4906, 2005.

LAHM, G. P.; CORDOVA, D.; BARRY, J. D. New and selective ryanodine receptor activators for insect control. . **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 4127-4133, 2009.

MACRAE, T. C.; BAUR, M. E.; BOETHEL, D. J.; FITZPATRICK, B. J.; GAO, A.; GAMUNDI, J.C.; HARRISON, L.A.; KABUYE, V. T.; MCPHERSON, R. M.; MIKLOS J. A.; PARADISE, M. S.; TOEDEBUSCH, A. S.; VIEGAS, A. Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high – Dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A gene for control of Lepidoptera. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, p. 577-587, 2005.

MARTINELLI, S.; OMOTO, C. Resistência de lepidópteros-praga a inseticidas na cultura do algodão no Brasil. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 10, p. 1167-1182, 2006.

MARTINS, E.S.; QUEIROZ, P.R.; LIMA, L.H.C.; MONNERAT, R.G. Análise da variabilidade genética de uma população de *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 17, 2005.

MARTINS, G. L. M.; TOMQUELSKI, G. V. Eficiência de inseticidas no controle de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura da soja. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MG, v. 2, p. 25-30, 2015.

MILKS, M. L.; MYERS, J. H. Cabbage looper resistance to a nucleopolyhedrovirus confers cross-resistance to two granuloviruses. **Environmental Entomology**, v. 32, p. 286–289, 2003.

MISOF, B.; LIU, S.; MEUSEMANN, K.; PETERS, R. S.; DONATH, A. MAYER, C., ... BEUTEL, R. G. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. **Science**, v. 346, p. 763–767, 2014.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of Baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 257-289, 1999.

MOSCARDI, F. Soybean integrated pest management in Brazil. **FAO Plant Protection Bulletin**, v. 41, p. 91-100, 1993.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus para o controle da lagarta-da-soja. In: AVES, S. B. Controle microbiano de insetos. **São Paulo: Manole**, p. 186-202, 1986.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E. B., MOSCARDI, M. L.; SZEWCZYK, B. Baculovirus pesticides: present state and future perspectives. In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL, J. (Eds.) **Microbes and Microbial Technology**. New York. Springer, p. 415– 445, 2011.

MOSCARDI, F. A nucleopolyhedrosis for control of the velvetbean caterpillar in Brazilian soybeans. In: VINCENT, C.; GOETTEL, M.S. LAZAROVITS, G. Biological control: a global perspectives: case studies from around the world. **CAB International/AAFC**, Wallingford, United Kingdom, p. 344-352, 2007.

MOSCARDI, F.; BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; POMARI, A. F.; CORSO, I. C.; YANO, S. A. C. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMAN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. Soja: Manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. **Brasília: Embrapa**, p. 213-334, 2012.

MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In: COPPING, L. G.; GREEN, M. B.; RESS, R. T. (Eds.) Pest Management in Soybean. **Elsevier, London-New York**, p. 98–109, 1992.

MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D. R. A case study in biological control: soybean defoliating caterpillars in Brazil. In: **International Crop Science Congress**, 1, 1992, Ames, Iowa. Madison: Crop Science Society of America, p. 115-119, 1993.

MURARO, D.S.; GIACOMELLI, T.; STACKE, R.F.; GODOY, D.N.; MARCON, P.; POPHAM, H.J.R.; BERNARDI, O. Baseline susceptibility of Brazilian populations of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) to *C. includens* nucleopolyhedrovirus and diagnostic concentration for resistance monitoring. **Journal of Economic Entomology**, v. 112, p. 349–354, 2018.

MUTERO, A.; PRALAVORIO, M.; BRIDE, J.; FOURNIER, D. Resistance-associated point mutations in insecticide in sensitive acetylcholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 91, p. 5922-5926, 1994.

NAUEN, R. Perspectives Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor. **Pest Management Science**, v. 62, p. 690–692, 2006.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 294-307, 2006.

OMOTO, C.; BERNARDI, O. Estratégias de manejo podem prolongar vida útil das tecnologias de milho Bt. **Visão Agrícola**, v. 13, p. 107-109, 2015.

OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R. J.; DOURADO, P. M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R. A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest**

Management Science, v. 72, p. 1727-1736, 2016.

PAVINATO, V. A.; MARTINELLI, S.; DE LIMA, P. F.; ZUCCHI, M. I.; OMOTO, C. Microsatellite markers for genetic studies of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Genetics and molecular research**, v. 12, p. 370-380, 2013.

PERINI, C. R. Eficiência de inseticidas químicos e identificação de mecanismos moleculares de resistência a piretróides em *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae). Tese (Doutorado), 2018.

PINTO, L. R.; VIEIRA, M. L. C.; SOUZA, JR. C. L.; SOUZA, A. P. Reciprocal recurrent selection effects on the genetic structure of tropical maize populations assessed at microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 355-364, 2003a.

PINTO, L. R.; VIEIRA, M. L. C.; SOUZA, JR. C. L.; SOUZA, A. P. Genetic-diversity assessed by microsatellites in tropical maize populations submitted to a high-intensity reciprocal recurrent selection. **Euphytica**, v. 134, p. 277-286, 2003b.

RAFFA, K. F. & PRIESTER, T. M. Synergists as research tools and control agents in agriculture. **Journal of Agricultural Entomology**, v. 2, p. 27-45, 1985.

POZEBON, H.; ARNEMANN, J. A. Como funcionam as diamidas? Portal Mais Soja. 2021. Disponível: <<https://maissoja.com.br/como-funcionam-as-diamidas/>>. Acesso em: 21 jan. 2021.

RAHMAN, M. M.; RASHID, H.; SHAHID, A. A.; BASHIR, K.; HUSNAIN, T.; RIAZZUDIN, T. Insect resistance and risk assessment studies of advanced generations of basmati rice expressing two genes of *Bacillus thuringiensis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 241-251, 2007.

REICHELDERFER, C. F.; BENTON, C. V. Some genetic aspects of the resistance of *Spodoptera frugiperda* to a nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 23, p. 378-382, 1974.

RODRIGUES, L.A. Estrutura genética de *Chrsohyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler ex Miq) Engl. (Sapotaceae) por marcadores microssatélites. Tese (Doutorado), 2014.

ROUSH, R. T.; MCKENZIE, J. A. Ecological genetics of insecticide and acaricide

resistance. **Annual Review of Entomology**, v. 32, p. 361-380, 1987.

ROUSH, R. T.; MILLER, G. L. Considerations for desing of insecticide resistance monitoring programs. **Journal of Economy Entomology**, v. 79, p. 293-298, 1986.

SALGADO, V. L. Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates. **Pesticides Biochemistry and Physiology**, v. 60, p. 98-102, 1998.

SAVIO, G. M.; PINOTTI, E. B. Controle biológico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) por *Baculovirus anticarsia*. In: **Anais do XI Simpósio de Ciências Aplicadas da FAEF**, 2008, Garça/SP. Anais... Garça: Editora FAEF, v.2, p. 95-100, 2008.

SCHLÖTTERER, C.; AMOS, B.; TAUTZ, D. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. **Nature**, v. 354, p. 63-65, 1991.

SIMONATO, J.; GRIGOLLI, J. F. J.; DE OLIVEIRA, H. N. Controle biológico de insetos-praga na soja. **Tecnologia e Produção: Soja**, p. 178-193, 2013.

SOBERÓN, M.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 1337-1349, 2009.

SOLÉ-CAVA, A.J.; CUNHA, H.A. A genética e a conservação da natureza. In: *Biologia Molecular e Evolução* (Eds Mاتيoli, S.R. and Fernandes, F.M.C.), Holos, **Ribeirão Preto**. p. 217-238, 2012.

SOSA-GÓMEZ, D. R. Intraspecific variation and population structure of the Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 378-384, 2004.

SOSA-GÓMEZ, D. R. Microbial Control of Soybean Pest Insects and Mites. **Microbial Control of Insect and Mite Pests**, p. 199–208, 2017.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; LASTRA, C. C. L.; HUMBER, R. A. An overview of arthropod-associated fungi from Argentina and Brazil. **Mycopathologia**, v. 170, p. 61–76, 2010.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; MIRANDA, J. E. Custo adaptativo da resistência de *Bacillus thuringiensis* na lagarta-da-soja, *Anticarsia gematalis*. IN: Reunião da Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil. Resumos...São Pedro: **Embrapa Soja**, resumo 18, 2011.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; OMOTO, C. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. In: HOFFMAN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-praga. **Brasília: Embrapa**, p. 673–724, 2012.

SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.17, p.495-503, 2015.

SPARKS, T. C.; NAUEN, R. Irac: mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 122-128, 2015.

TABASHNIK, B.; SISTERSON, M.; ELLSWORTH, P.; DENNEHY, T.; ANTILLA, L.; LIESNER, L.; CARRIÈRE, Y. Suppressing resistance to Bt cotton with sterile insect releases. **Nature Biotechnology**, v.28, p.1304-1307, 2010.

TOHNISHI, M.; NAKAO, H.; KOHNO, E.; NISHIDA, T.; FURUYA, T.; SHIMIZU, T. et al. **European Patent** 1447396, 1999.

VALLE, G. E.; LOURENÇÃO, A. L.; ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; ABREU, A. G. Population variability of *Bemisia tabaci* (Genn.) in different hosts. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 4615-4624, 2013.

WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, v. 7, p. 524-530, 1990.

YANO, S. A. C.; SANTANA, G. K. S.; NEIVA, M. M.; MOSCARDI, F.; MARTINELLI, S.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Tolerância de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, *Pseudoplusia includens* (Walker) e *Rachiplusia nu* (Guenée) à proteína Cry1Ac. In: Congresso Brasileiro de soja. Anais, **Brasília, DF: Embrapa**, 2012.

YANO, S.A.C.; SPECHT, A.; MOSCARDI, F.; CARVALHO, R. A.; DOURADO, P. M.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P.; SOSA-GÓMEZ, D. R. High susceptibility and low resistance allele frequency of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) field populations to Cry1Ac in Brazil. **Pest Management Science**, 71, p. 1578-1584, 2015.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1–16, 2002.

CAPÍTULO 2. ATIVIDADE DE BIOINSETICIDAS COMBINADOS COM AGENTES QUÍMICOS COM POTENCIAL SINERGISTA SOBRE POPULAÇÕES DE *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae) SUSCETÍVEL E RESISTENTE À PROTEÍNA Cry1Ac.

2.1 RESUMO

Inseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* e vírus têm sido utilizados no controle biológico de pragas em várias regiões do mundo, devido à sua especificidade e segurança para organismos não-alvo. No entanto, a sua aceitação como bioinseticidas é limitada. Para contornar essas limitações e melhorar o desempenho do vírus de poliedrose nuclear (NPV) e dos bioinseticidas Agree®, Dipel® e Xentari®, agentes químicos com potencial sinergista têm sido estudados. Este trabalho teve como objetivo determinar se a atividade viral de AgMNPV e produtos à base de Bt podem ser aumentadas pelo uso de branqueadores ópticos, potencializando o efeito inseticida no controle de *Anticarsia gemmatalis* suscetível e resistente à proteína Cry1Ac. Foram testados um isolado de NPV de *A. gemmatalis* (AgMNPV) e bioinseticidas a base de *B. thuringiensis*, combinados com quatro produtos (Fluorescent Brightener 28 (FB 28); Calcofluor White Stain; ácido bórico; e umbeliferona) em concentrações de 0,025 a 1,5%. Os branqueadores ópticos foram adicionados a concentrações únicas dos bioinseticidas e incorporados a dieta artificial, sem formol e antibiótico, e oferecido a lagartas de terceiro instar. A análise dos dados de mortalidade de *A. gemmatalis* indica que a adição de FB 28 (0,1% m/v) apresenta um efeito sinérgico quando associado à todos os bioinseticidas testados, aumentando a mortalidade de *A. gemmatalis* resistente. Os outros compostos apresentaram efeitos negativo, aditivo ou neutro. Conclui-se que a inclusão de substâncias com atividade semelhante ao branqueador óptico FB 28 em formulações de AgMNPV e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* cepa HD-1 (Dipel); var. *aizawai* GC-91 (Xentari e Agree) com o objetivo de aumentar a eficiência destes produtos pode ser uma opção de uso no controle de *A. gemmatalis* resistentes a Cry1Ac.

Palavras-chave: lagarta-da-soja; inseticidas biológicos, branqueadores ópticos.

ABSTRACT

Insecticides based on *Bacillus thuringiensis* and viruses have been used in biological pest control in several regions of the world, due to their specificity and safety for non-target organisms. However, their acceptance as bioinsecticides is limited. In order to overcome these limitations and improve the performance of the nuclear polyhedrosis virus (NPV) and the bioinsecticides Agree®, Dipel® and Xentari®, chemical agents with a synergistic potential have been studied. This work aimed to determine if the viral activity of AgMNPV and Bt-based products can be increased by the use of optical brighteners, potentiating the insecticidal effect in the control of *Anticarsia gemmatalis* susceptible and resistant to the Cry1Ac protein. An NPV isolate from *A. gemmatalis* (AgMNPV) and bioinsecticides based on *B. thuringiensis* were tested, combined with four products (Fluorescent Brightener 28 (FB 28); Calcofluor White Stain; boric acid; and umbeliferone) in concentrations of 0.025 to 1.5%. The optical brighteners were added to unique concentrations of bioinsecticides and incorporated into the artificial diet, without formaldehyde and antibiotics, and offered to third instar caterpillars. The analysis of the mortality data of *A. gemmatalis* indicates that the addition of FB 28 (0.1% w / v) has a synergistic effect when associated with all bioinsecticides tested, increasing the mortality of resistant *A. gemmatalis*. The other compounds showed negative, additive or neutral effects. It is concluded that the inclusion of substances with activity similar to the optical brightener FB 28 in formulations of AgMNPV and *B. thuringiensis* var. *kurstaki* strain HD-1 (Dipel); var. *aizawai* GC-91 (Xentari and Agree) aiming to increase the efficiency of these products may be an option of use in the control of *A. gemmatalis* resistant to Cry1Ac.

Keywords: velvetbean caterpillar; biological insecticides, optical brighteners.

2.2 INTRODUÇÃO

A soja *Glycine max* (L.) Merrill está entre as principais commodities produzidas no Brasil e, por ocupar uma área em torno 36 milhões de hectares (CONAB, 2019), está sujeita ao ataque de uma vasta gama de artrópodes-praga, entre elas as lagartas desfolhadoras. Dentre as principais espécies está *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidæ) amplamente distribuída no continente americano, causando perdas na produção em todas as áreas onde a soja é cultivada (SOSA-GÓMEZ, 2004).

O controle da lagarta-da-soja é realizado por inseticidas químicos, bioinseticidas e cultivares transgênicas que expressam a proteína Cry. No entanto, aplicações constantes de agrotóxicos afetam o equilíbrio do agroecossistema por eliminar inimigos naturais (BUENO et al., 2011), além propiciar a seleção de populações de insetos resistentes (SOSA-GÓMEZ; OMOTO, 2012). O uso de entomopatógenos como fungos, vírus e bactérias no controle biológico de pragas se apresenta como alternativa em áreas que recebem frequentes aplicações de inseticidas químicos (ROSSI-ZALAF et al., 2008), auxiliando no manejo de populações resistentes, seguindo as premissas do manejo integrado de pragas (MIP).

Dentre as alternativas do controle biológico estão os vírus de poliedrose nuclear que destacam-se por sua virulência e especificidade em relação ao hospedeiro, oferecendo assim segurança a organismos não alvos, vertebrados e ao meio ambiente (MOSCARDI, 1998), produtos que contêm em suas formulações a bactéria gram-positiva e aeróbica *Bacillus thuringiensis* que, no processo de esporulação, produz inclusões cristalinas compostas por proteínas denominadas endotoxinas (MOHAN & GUJAR, 2001). Um dos principais programas de controle biológico já realizado, envolvendo o uso de baculovírus, foi o *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) no Brasil, para controle da lagarta-da-soja (MOSCARDI, 1999). Vem sendo utilizado, em outros países da América Latina, como Argentina, Bolívia e Paraguai (HAASE et al., 2015). No entanto, alguns gargalos ainda limitam sua expansão como agentes de controle biológico.

Os produtos à base de *B. thuringiensis* Dipel®, Xentari® e Agree® são formulados em preparações de esporos-cristal derivados de algumas estirpes de tipo selvagem, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 com Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa;

ou var. *aizawai* HD-137 que produz Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca e Cry1Da (SANAYUJA et al., 2011). A vantagem, quando comparado ao vírus, é que por ser um inseticida biológico tem ação mais rápida e pode ser aplicado quando as populações da praga tenham ultrapassado as densidades recomendadas para o uso do baculovírus (BUENO et al., 2012).

No entanto, a disponibilidade de toxinas Bt em grandes áreas traz uma grande preocupação, que é a seleção de genótipos de insetos resistentes a essas toxinas (GOULD, 1998), sendo que o mesmo pode acontecer com o baculovírus. Estudos relataram que *Chloridea* (= *Heliothis*) *virescens* (Fabricius, 1781) coletadas do campo desenvolveram resistência de 500 vezes à proteína Cry1Ac após 19 gerações em laboratório (GOULD et al., 1995). Após sete gerações de seleção, *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) desenvolveu resistência de até 100 vezes à toxina Bt (LUTTRELL et al., 1999), bem como a capacidade de *C. virescens* de adquirir resistência ao Bt (STONE et al., 1989). Espécies de lepidópteros podem ser ordenadas de modo crescente a tolerância à toxina Cry1Ac, sendo *C. virescens*, *A. gemmatilis*, *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852), e *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (ALBERNAZ, 2012; YANO et al., 2012).

Visando melhorar a eficiência de bioinseticidas e reduzir a pressão de seleção de artrópodes-praga, agentes químicos têm sido estudados (LASA et al., 2007; OKUNO et al., 2003; MARTÍNEZ et al., 2010; ZAMORA-ÁVILES et al., 2013). A interação de microrganismos com produtos químicos pode resultar em efeitos sinérgicos, nulos ou danosos sobre os agentes de controle biológico (ALVES et al., 1998). Fluorescent Brightener 28 (FB 28), também conhecido como Calcofluor 28, Tinopal UNPA-GX e Calcofluor M2R (JENSEN et al., 1998; TSUJI et al., 1995), é um branqueador fluorescente que se liga fortemente à quitina e celulose, muito utilizado como corante de parede celular em plantas superiores, algas e fungos, por apresentar fluorescência aumentada ao se ligar à quitina (HERTH & SCHNEPF, 1980). Outra opção são os branqueadores ópticos derivados do ácido estilbeno, que podem aumentar a atividade viral, ocasionando efeito sinérgico na associação com baculovírus em isolados de lepidópteros (MORALES et al., 2001; SHAPIRO, 2000). A umbeliferona também é conhecida por sua ação como branqueador óptico, uma substância orgânica natural pertencente à família das cumarinas. Assim, branqueadores ópticos atuam inibindo a síntese de quitina na membrana peritrófica,

tornando o intestino médio mais suscetível a agentes infecciosos (SHEPPARD & SHAPIRO, 1994; WANG & GRANADOS, 2000; REDDY et al., 2008), além de retardar significativamente o desenvolvimento larval (ZHU et al., 2007).

No entanto, resultados opostos sobre a ação destes produtos como agentes sinergistas têm sido encontrados na literatura, o que indica que a ação promovida pelos branqueadores ópticos depende do sistema de interação patógeno-planta-inseto (BLACK et al., 1997). Sendo assim, o uso destes produtos como agentes sinergistas de bioinseticidas no controle *A. gemmatalis* ainda requer estudos de validação de seu uso.

Assim, o objetivo deste estudo foi determinar se a atividade viral de AgMNPV e produtos com Bt em suas composições podem ser aumentadas pelo uso de branqueadores ópticos, potencializando o efeito inseticida no controle de *A. gemmatalis* suscetível e resistente à proteína Cry1Ac.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no ano de 2019, na Embrapa Soja, localizada em Londrina, PR, no laboratório de entomologia, com duas populações de *A. gemmatalis*, uma suscetível e outra resistente 391 vezes à proteína Cry1Ac, no período de montagem dos bioensaios. A população foi obtida a partir da seleção de uma população suscetível coletada na cultura de soja na região de Sertãoópolis, PR, na safra de 1995/1996. A população resistente à toxina Cry1Ac foi obtida através da pressão de seleção realizada em condições de laboratório, através de 350 gerações, exercida com inoculações sucessivas da bactéria HD-73, que produz exclusivamente a toxina Cry1Ac.

2.3.1 Colônias de *Anticarsia gemmatalis*

Os insetos utilizados neste estudo foram obtidos a partir da criação de manutenção de lagartas da Embrapa Soja. Os adultos foram mantidos em gaiolas para oviposição e as lagartas foram criadas em dieta artificial de Greene et al. (1976), modificada por Hoffman Campo et al., (1985), mantidas em câmara climatizada a 26° C, 60% UR, e fotofase de 14 horas. As lagartas foram criadas em copos descartáveis

e os experimentos foram realizados com insetos da geração seguinte após pressão de seleção.

2.3.2 Bioinseticidas

O vírus de poliedrose nuclear (NPV) disponível na coleção de vírus entomopatogênicos da Embrapa Soja, armazenado a -20 °C. AgMNPV (CNPSo-VPN79) foi obtido a partir da coleta de lagartas de *A. gemmatalis* na região de Londrina em 1979. E os produtos à base de *B. thuringiensis* foram os: *B. t.* var. *kurstaki* cepa HD-1 (Dipel®, SC 33,6 g/L); *B. t.* var. *aizawai* GC-91 (Xentari®, WG 540 g/L) e (Agree®, WP 500g/Kg) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Concentração do vírus AgMNPV e dos produtos Dipel®, Xentari® e Agree® utilizados nas populações resistente e suscetível a proteína Cry1Ac de *Anticarsia gemmatalis*.

Bioinseticida	Concentrações	
	<i>A. gemmatalis</i> (suscetível)	<i>A. gemmatalis</i> (resistente)
AgMNPV (CNPSo-VPN79)	240 CO/mL	240 CO/mL
Dipel® (var. <i>kurstaki</i>)	0,25 µg/mL	10,42 µg/mL
Xentari® (var. <i>aizawai</i>)	2,36 µg/mL	25,75 µg/mL
Agree® (var. <i>aizawai</i>)	2,88 µg/mL	52,09 µg/mL

CO/mL: corpos de oclusão/mililitro.

2.3.3 Produtos com potencial sinergista

Quatro produtos, em diferentes concentrações, foram combinados com os bioinseticidas (**Tabela 2**).

Tabela 2. Relação de produtos com potencial sinergista utilizados em combinação com o vírus AgMNPV e os produtos Dipel®, Xentari® e Agree®.

Produto	Fórmula Química	Grupo Químico	Empresa	Concentração
Ácido Bórico	H_3BO_3	Ácido médio	Quimidrol	0,05% e 0,1% (m/v)
Calcofluor White Stain	$C_{40}H_{44}N_{12}O_{10}S_2 + C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$	Derivado do ácido estilbeno (0,1%) + corante (0,05%)	Fluka	1,0% e 1,5% (v/v)
Fluorescent Brightener 28 (FB 28)	$C_{40}H_{44}N_{12}O_{10}S_2$	Derivado do ácido estilbeno	Sigma-Aldrich	0,025%, 0,05% e 0,1% (m/v)
Umbeliferona	$C_9H_6O_3$	Derivado de cumarinas: 7-hidroxycumarina	Sigma-Aldrich	0,1% e 0,5% (m/v)

m/v: massa/volume; v/v: volume/volume

2.3.3 Bioensaios com vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatilis* (AgMNPV) e os produtos comerciais de *Bacillus thuringiensis* combinados a agentes químicos com potencial sinergista

Os bioensaios foram conduzidos de forma independente para cada população de *A. gemmatilis* (suscetível e resistente), sendo 20 tratamentos para cada bioinseticida, com 64 subamostras e três repetições com delineamento experimental inteiramente casualizado e os tratamentos em arranjo fatorial.

Concentrações únicas correspondentes a CL₅₀ (**Tabela 1**) dos bioinseticidas foram diluídas em água destilada e, em seguida, a suspensão foi incorporada na dieta artificial a $50^\circ C \pm 1^\circ C$ durante o processo de esfriamento. A dieta era livre de antibiótico, nipagin e formol (HOFFMANN et al., 1985). Os bioinseticidas foram incorporados de forma isolada e, em mistura com branqueadores ópticos, as testemunhas foram alimentadas com dieta contendo (testemunhas positivas) ou não (testemunha negativas) os sinergistas. Após a homogeneização com o auxílio de uma batedeira, a dieta contendo cada tratamento foi vertida em bandejas plásticas (32 células de 27 ml; Advento do Brasil, Diadema, SP). Em cada célula da bandeja foi transferida uma lagarta de terceiro instar que foi mantida em B.O.D. (demanda

bioquímica de oxigênio) a $26 \pm 2^\circ\text{C}$; $70 \pm 10\%$ e 14h de fotofase. Nos tratamentos com o vírus AgMNPV, a mortalidade foi avaliada diariamente do primeiro ao décimo dia e nos tratamentos com os produtos à base de *B. thuringiensis*, as avaliações do número de lagartas mortas foram até o sétimo dia.

2.3.4 Análise Estatística

Os métodos estatísticos utilizados foram o estimador não-paramétrico para a função de sobrevivência por Kaplan-Meier e as comparações de funções de sobrevivência pelo teste Logrank (PINTILIE, 2006). Os dados obtidos nos bioensaios foram submetidos à análise exploratória para avaliar as pressuposições de normalidade dos resíduos (SHAPIRO & WILK, 1965), e a homogeneidade de variância dos tratamentos por aplicação da ANOVA (BURR & FOSTER, 1972).

O tipo de interação entre os agentes químicos com potencial sinergista e o isolado de AgMNPV e os produtos à base de *B. thuringiensis* foram determinadas em função do fator de cotoxicidade (CTF) calculado a partir da equação proposta por (MANSOUR et al., 1966):

$$\text{CTF} = \frac{(O_c - O_e)}{O_e} \times 100$$

Onde:

O_c: porcentagem de mortalidade observada na combinação entre o produto com potencial sinergista e o bioinseticida

O_e: porcentagem da mortalidade esperada, isto é, a soma da porcentagem de mortalidade obtida em cada tratamento individualmente.

Os resultados foram divididos em três categorias: CTF positivo, igual ou superior a 20 ocorreu sinergismo, CTF negativo, igual ou inferior a -20, o efeito foi antagônico e CTF entre -20 e +20, o efeito foi considerado aditivo ou neutro.

O tempo médio de mortalidade foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{TMM} = \frac{\sum (D_3 * N_3 + D_4 * N_4 + \dots + D_n * N_n)}{N_{\text{Total}}}$$

Onde:

D= dia de avaliação

N= número de lagartas mortas no dia D

N total= número total de lagartas mortas no tratamento.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Efeito da adição de branqueadores ópticos a AgMNPV na mortalidade de *Anticarsia gemmatalis* suscetível e resistente à proteína Cry1Ac

Os efeitos ocasionados pelos agentes químicos adicionados ao vírus AgMNPV estão descritos na tabela 3. A mortalidade de lagartas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes nos tratamentos com a presença de produtos químicos, mas sem o baculovírus, foi superior à testemunha (somente dieta) na maioria dos casos. Porém, por apresentarem mortalidade de lagartas em taxas relativamente baixas, o efeito de toxicidade destes compostos nestas espécies mostra-se limitado, exceto o ácido bórico que ocasionou a mortalidade das lagartas acima de 50% na população resistente, chegando próximo a 100% na concentração 0,1%, demonstrando a alta toxicidade deste produto (**Tabela 3**).

Fluorescent Brightener 28 (FB 28) foi o único produto que ocasionou interação sinérgica, quando combinado com AgMNPV (Tabelas 2 e 3). Quando o branqueador e o bioinseticida foram ingeridos de forma simultânea pelos insetos ocorreu efeito sinérgico em todas as concentrações na população resistente à Cry1Ac, enquanto que na população suscetível apenas ocorreu interação no tratamento AgMNPV + FB (0,1%), nas quantidades 0,025 e 0,05 %, as interações foram antagônicas. O tratamento com FB 28 (0,1%) adicionado ao vírus de poliedrose aumentou significativamente a mortalidade em ambas populações quando comparado ao tratamento que somente o vírus foi incorporado a dieta. A mortalidade em larvas de 3º instar de *A. gemmatalis* foi de 31,25% para 85,9% em lagartas suscetíveis e de 6,25% para 46,8% em lagartas resistentes à Cry1Ac. O tempo médio de mortalidade foi menor nas três concentrações de FB 28 nas lagartas resistentes (**Tabela 3**).

Com relação às demais combinações, foram observados efeitos aditivos, onde a mortalidade foi ocasionada apenas pelo efeito do vírus ou pela toxicidade do produto como foi o caso do ácido bórico, salvo o produto umbeliferona que a interação foi antagônica para ambas as populações (**Tabelas 3**).

Tabela 3. Efeito de agentes químicos adicionados a AgMNPV na mortalidade de lagartas de 3º ínstar de *Anticarsia gemmatalis* suscetível e resistente à proteína Cry1Ac.

Tratamentos	N	% mortalidade	TMM	Oc	Oe	CTF	Efeito	% mortalidade TMM							
								A. gemmatalis suscetível CL₅₀ = 240 CO/mL							A. gemmatalis resistente CL₅₀ = 240 CO/mL
Testemunha	64	0,00	0,00					7,81	6,40						
AgMNPV	64	31,25	7,35					6,25	8,50						
Ac. bórico (0,05%)	64	7,81	4,20					51,56	7,45						
Ac. bórico (0,1%)	64	45,31	6,45					95,31	4,95						
AgMNPV + ac. bórico (0,05%)	64	40,62	6,77	40,62	39,06	4,0	Aditivo	51,56	9,39	51,56	57,81	-10,8			Aditivo
AgMNPV + ac. bórico (0,1%)	64	81,25	7,48	81,25	76,56	6,1	Aditivo	89,06	4,61	89,06	100,00	-10,9			Aditivo
Calcofluor (1,0%)	64	1,56	7,00					3,12	5,5						
Calcofluor (1,5%)	64	3,12	7,00					1,56	4,00						
AgMNPV + Calcofluor (1,0%)	64	28,12	8,05	28,12	32,81	-14,3	Neutro	10,94	7,43	10,94	9,37	16,8			Aditivo
AgMNPV + Calcofluor (1,5%)	64	25,00	8,19	25,00	34,37	-27,3	Antagônico	7,81	8,00	7,81	7,81	0,0			Aditivo
FB 28 (0,025%)	64	9,37	7,16					4,69	8,00						
FB 28 (0,05%)	64	0,00	0,00					1,56	1,00						
FB 28 (0,1%)	64	9,37	5,83					0,00	0,00						
AgMNPV + FB 28 (0,025%)	64	29,69	7,26	29,69	40,62	-26,9	Antagônico	21,87	6,21	21,87	10,94	99,9			Sinergismo
AgMNPV + FB 28 (0,05%)	64	25,00	7,87	25,00	31,25	-21,0	Antagônico	12,50	5,50	12,50	7,81	60,1			Sinergismo
AgMNPV + FB 28 (0,1%)	64	85,94	7,05	85,94	40,62	111,57	Sinergismo	46,87	6,53	46,87	6,25	649,9			Sinergismo
Umbeliferona (0,1%)	64	4,69	9,66					18,75	7,16						
Umbeliferona (0,5%)	64	3,12	2,00					9,37	7,83						
AgMNPV + Umbel. (0,1%)	64	26,56	7,94	26,56	35,94	-26,09	Antagônico	12,5	7,87	12,5	25,00	-50,0			Antagônico
AgMNPV + Umbel. (0,5%)	64	15,62	8,80	15,62	34,37	-54,55	Antagônico	10,84	5,00	10,84	15,62	-30,0			Antagônico

CTF: fator de cototoxicidade. Oc: mortalidade observada na combinação entre produto e NPV. Oe: porcentagem da mortalidade esperada (soma da porcentagem de mortalidade obtida em cada tratamento individualmente). TMM: tempo médio de mortalidade. N: número amostral.

2.4.2 Efeito da adição de branqueadores ópticos a bioinseticidas na mortalidade de *Anticarsia gemmatalis* suscetível e resistente à proteína Cry1Ac

Os resultados das interações entre os agentes químicos e os produtos biológicos com a bactéria *B. thuringiensis* em suas formulações estão expostos nas tabelas de 4 a 6. Nos tratamentos com a presença dos agentes químicos isolados, sem os bioinseticidas, o ácido bórico registrou alta toxicidade na concentração 0,1%, ocasionando mortalidade de $\geq 50\%$ na população resistente para os produtos Dipel e Xentari (**Tabelas 4 e 5**). Porém, no restante dos produtos químicos, na maioria dos tratamentos, a mortalidade de lagartas foi relativamente baixa em ambas as populações, indicando ter baixa toxicidade para os insetos (**Tabelas 4 a 6**).

O Fluorescent Brightener 28 (FB 28) foi o único produto que ocasionou interação sinérgica na concentração 0,1% quando combinado com os três bioinseticidas na população resistente. A mortalidade no tratamento com Dipel foi de 25 % e em sua combinação com FB 28 foi de 57,81%, o mesmo ocorreu para Xentari em que a mortalidade foi de 25 % para 46,87 % e com Agree de 21,87 % para 62,5 % de indivíduos mortos (**Tabelas 4 a 6**), uma vez que as lagartas suscetíveis à proteína Cry1Ac não tiveram incremento da mortalidade com nenhum dos agentes químicos, quando foram combinados com Xentari. Entretanto, na aplicação do Dipel combinado ao FB 28 (0,1%) a mortalidade apresentou incremento de 37,5 para 50 %. As comparações das porcentagens de mortalidade de *A. gemmatalis* tratadas com Agree e sua aplicação com calcofluor (1,0%) e FB 28 (0,05 e 0,1 %) indicam sinergismo, com mortalidades entre 51,56 e 62,5 %.

O tempo médio de mortalidade, calculado pela equação (TMM), nos tratamentos que ocorreram as interações sinérgicas, não foi menor quando comparados aos tratamentos em que os bioinseticidas foram aplicados isolados (**Tabela 4 a 6**).

Com relação às demais combinações, foram observados efeitos aditivos ou neutros, onde a mortalidade foi ocasionada apenas pelo efeito dos bioinseticidas ou pela toxicidade do produto e efeitos antagônicos, um vez que a mortalidade ficou abaixo quando os bioinseticidas estavam em mistura em relação aos que estavam isolados (**Tabelas 4 a 6**).

Tabela 4. Efeito de agentes químicos adicionados ao bioinseticida Dipel® na mortalidade de lagartas de 3º instar de *Anticarsia gemmatilis* suscetível e resistente à proteína Cry1Ac.

Tratamentos	N	% mortalidade			Oe	CTF	Efeito	% mortalidade			Oe	CTF	Efeito
		TMM	Oc					TMM	Oc				
A. gemmatalis Suscetível CL ₅₀ = 0,25 µg/mL													
Testemunha	64	7,81	2,50					6,25	3,75				
Dipel	64	37,50	5,04					25,00	4,56				
Ac. bórico (0,05%)	64	14,06	5,44					25,00	2,44				
Ac. bórico (0,1%)	64	10,94	4,57					50,00	3,41				
Dipel + ac. bórico (0,05%)	64	31,25	4,25	31,25	51,56	-39,4	Antagônico	4,69	3,33	4,69	50,00	-90,6	Antagônico
Dipel + ac. bórico (0,1%)	64	51,56	4,30	51,56	48,44	6,44	Aditivo	26,56	3,12	26,56	75,00	-64,6	Antagônico
Calcofluor (1,0%)	64	0,00	0,00					9,37	3,33				
Calcofluor (1,5%)	64	0,00	0,00					18,75	1,75				
Dipel + Calcofluor (1,0%)	64	31,25	5,45	31,25	37,50	-16,7	Neutro	14,06	4,55	14,06	34,37	-59,1	Antagônico
Dipel + Calcofluor (1,5%)	64	34,37	4,68	34,37	37,50	-8,35	Neutro	17,19	3,54	17,19	43,75	154,5	Antagônico
FB 28 (0,025%)	64	3,12	1,00					37,50*	2,12				
FB 28 (0,05%)	64	3,12	4,00					18,75*	2,66				
FB 28 (0,1%)	64	0,00	0,00					9,37	2,33				
Dipel + FB 28 (0,025%)	64	23,44	4,66	23,44	40,62	-42,3	Antagônico	50,00	4,66	50,00	62,50	-20,0	Sinergismo
Dipel + FB 28 (0,05%)	64	21,87	4,07	21,87	40,62	-46,2	Antagônico	10,94	4,07	10,94	43,75	-75,0	Antagônico
Dipel + FB 28 (0,1%)	64	50,00	4,37	50,00	37,50	33,3	Sinergismo	57,81	4,37	57,81	34,37	68,2	Sinergismo
Umbelliferona (0,1%)	64	4,69	3,33					15,62	3,33				
Umbelliferona (0,5%)	64	3,12	1,00					6,25	1,00				
Dipel + Umbel. (0,1%)	64	17,19	4,18	17,19	42,19	-59,3	Antagônico	10,94	4,18	10,94	40,62	-73,1	Antagônico
Dipel + Umbel. (0,5%)	64	28,12	4,33	28,12	40,62	-30,8	Antagônico	9,37	4,33	9,37	34,37	-72,8	Antagônico

CTF: fator de cototoxicidade. Oc: mortalidade observada na combinação do sinergista e NPV. Oe: porcentagem da mortalidade esperada (soma da porcentagem de mortalidade obtida em cada tratamento individualmente). TMM: tempo médio de mortalidade. N: número amostral.

*Erros não controlados no experimento.

Tabela 5. Efeito de agentes químicos adicionados ao bioinseticida Xentari® na mortalidade de lagartas de 3º instar de *Anticarsia gemmatilis* suscetível e resistente à proteína Cry1Ac.

Tratamentos	N	% mortalidade	TMM	Oc	Oe	CTF	Efeito	% mortalidade	TMM	Oc	Oe	CTF	Efeito
A. gemmatilis Suscetível CL₅₀ = 2,36 µg/mL													
Testemunha	64	0,00	0,00					3,12	6,00				
Xentari	64	21,87	4,71					25,00	2,87				
Ac. bórico (0,05%)	64	0,00	0,00					7,81	4,40				
Ac. bórico (0,1%)	64	10,94	3,85					54,69	4,71				
Xentari + ac. bórico (0,05%)	64	10,94	4,86	10,94	21,87	-50,0	Antagônico	20,31	5,08	20,31	32,81	38,1	Antagônico
Xentari + ac. bórico (0,1%)	64	25,00	5,56	25,00	32,81	-23,8	Antagônico	60,94	5,72	60,94	79,69	23,5	Antagônico
Calcofluor (1,0%)	64	0,00	0,00					1,56	6,00				
Calcofluor (1,5%)	64	4,69	5,00					4,69	5,00				
Xentari + Calcofluor (1,0%)	64	6,25	3,50	6,25	21,87	-71,4	Antagônico	26,56	4,23	6,25	26,56	76,5	Antagônico
Xentari + Calcofluor (1,5%)	64	17,19	5,54	17,19	26,56	-35,3	Antagônico	37,50	4,25	17,19	29,69	42,1	Antagônico
FB 28 (0,025%)	64	0,00	0,00					6,25	5,75				
FB 28 (0,05%)	64	7,81	2,20					1,56	6,00				
FB 28 (0,1%)	64	6,25	6,25					4,69	3,00				
Xentari + FB 28 (0,025%)	64	6,25	4,75	6,25	21,87	-71,4	Antagônico	29,69	4,84	29,69	31,25	5,00	Aditivo
Xentari + FB 28 (0,05%)	64	6,25	3,50	6,25	29,68	-79,0	Antagônico	29,68	4,42	29,68	26,56	11,8	Aditivo
Xentari + FB 28 (0,1%)	64	12,50	5,00	12,50	28,12	-55,6	Antagônico	46,87	3,60	46,87	29,69	57,9	Sinergismo
Umbeliferona (0,1%)	64	7,81	4,00					4,69	4,00				
Umbeliferona (0,5%)	64	0,00	0,00					0,00	0,00				
Xentari + Umbel. (0,1%)	64	0,00	0,00	0,00	29,68	100,0	Antagônico	32,81	4,09	32,81	29,69	10,5	Aditivo
Xentari + Umbel. (0,5%)	64	1,56	4,00	1,56	21,87	-92,9	Antagônico	37,50	4,92	37,50	25,00	50,0	Sinergismo

CTF: fator de cotoxidade. Oc: mortalidade observada na combinação do sinergista e NPV. Oe: porcentagem da mortalidade esperada (soma da porcentagem de mortalidade obtida em cada tratamento individualmente). TMM: tempo médio de mortalidade. N: número amostral.

Tabela 6. Efeito de agentes químicos adicionados ao bioinseticida Agree® na mortalidade de lagartas de 3° instar de *Anticarsia gemmatilis* suscetível e resistente à proteína Cry1Ac.

Tratamentos	N	% mortalidade	TMM	Oc	Oe	CTF	Efeito	% mortalidade	TMM	Oc	Oe	CTF	Efeito
A. gemmatilis Suscetível CL₅₀ = 2,88 µg/mL													
Testemunha	64	6,25	4,75										
Agree	64	28,12	4,11										
Ac. bórico (0,05%)	64	7,81	5,20										
Ac. bórico (0,1%)	64	26,56	3,58										
Agree + ac. bórico (0,05%)	64	34,37	4,27	34,37	35,93	-4,3	Aditivo						
Agree + ac. bórico (0,1%)	64	23,44	4,80	23,44	54,68	-57,1	Antagônico						
Calcofluor (1,0%)	64	6,25	7,00										
Calcofluor (1,5%)	64	17,19	6,63										
Agree + Calcofluor (1,0%)	64	51,56	3,66	51,56	34,37	50,0	Sinergismo						
Agree + Calcofluor (1,5%)	64	37,50	4,83	37,50	45,31	-17,2	Aditivo						
FB 28 (0,025%)	64	15,62	3,60										
FB 28 (0,05%)	64	10,94	3,14										
FB 28 (0,1%)	64	17,19	6,77										
Agree + FB 28 (0,025%)	64	32,81	5,67	32,81	43,74	-25,0	Aditivo						
Agree + FB 28 (0,05%)	64	54,69	4,57	54,69	39,06	40,0	Sinergismo						
Agree + FB 28 (0,1%)	64	62,50	5,27	62,50	45,31	37,9	Sinergismo						
Umbeliferona (0,1%)	64	6,25	3,50										
Umbeliferona (0,5%)	64	14,06	4,11										
Agree + Umbel. (0,1%)	64	26,56	5,47	26,46	34,37	-23,0	Antagônico						
Agree + Umbel. (0,5%)	64	23,44	4,27	23,44	42,18	-44,4	Antagônico						

CTF: fator de cotoxidade. Oc: mortalidade observada na combinação do sinergista e NPV. Oe: porcentagem da mortalidade esperada (soma da porcentagem de mortalidade obtida em cada tratamento individualmente). TMM: tempo médio de mortalidade. N: número amostral.

*Erros não controlado no experimento.

A. gemmatilis Resistente CL₅₀ = 52,09 µg/mL

2.5 DISCUSSÃO

O estudo evidencia que o FB 28 na concentração 0,1% foi o produto que com maior frequência proporcionou atividade sinérgica com os bioinseticidas. Isso fica evidenciado pelo expressivo aumento de mortalidade observada na população resistente de *A. gemmatalis*, quando este produto foi combinado com o vírus AgMNPV e produtos à base de *B. thuringiensis*. No caso de AgMNPV, foi observado sinergismo nas três concentrações de FB 28, sendo que a mortalidade de lagartas na dieta com a concentração 0,1% foi maior. Esse resultado é de grande importância, visto que a lagarta-da-soja pode desenvolver genótipos resistentes a produtos biológicos. No entanto, a maioria dos demais possíveis sinergistas não causaram efeito potencializador da atividade dos bioinseticidas testados, exceto a umbeliferona (0,5%) que, em mistura com *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Xentari), ocasionou aumento na mortalidade.

O ácido bórico apresentou efeito tóxico quando foi aplicado isolado na concentração 0,1%, o que difere dos resultados encontrados para espécies de *A. gemmatalis* (MORALES et al., 2001), *Spodoptera frugiperda* (CISNEROS et al., 2001) e *Limantria dispar* L. (SHAPIRO & BELL, 1982), que relatam a redução da CL₅₀ de suas baculoviroses em combinação com ácido bórico, em concentrações que chegam a 1% e que isolado não causou mortalidade das lagartas. Frequentemente, é relatada uma grande variação de resultados obtidos na interação de diferentes produtos químicos, isolados virais e espécies de insetos hospedeiros. Assim, o sucesso da adição de branqueadores ópticos no aumento da atividade de bioinseticidas sofre influência não só da composição química do sinergista (BERNAL et al., 2014; OKUNO et al., 2003), como também da complexidade do sistema planta-vírus-hospedeiro ou vírus-hospedeiro (BLACK et al., 1997).

É descrita na literatura, que a incorporação de certos branqueadores ópticos em formulações de baculovírus podem melhorar significativamente sua patogenicidade, porém pouco se sabe desta interação com *B. thuringiensis* (IBARGUTXI et al., 2008). Casos de sucesso em que ocorreu aumento da mortalidade com o uso de branqueadores ópticos foram encontrados para *L. dispar* (PHYLLIS, 2004) e larvas de *H. armigera* que apresentaram maior suscetibilidade a *B. thuringiensis* (LI et al., 2001). No entanto o uso de

branqueadores derivados do ácido estilbeno em mistura com a cepa HD-1 (Dipel) em testes com *H. armigera* não apresentaram resultados positivos quanto a melhor eficiência do bioinseticida (IBARGUTXI et al., 2008), resultado que difere deste trabalho em que foi detectado o efeito sinérgico em todos os bioinseticidas testados em mistura com FB 28 na concentração 0,1% na população resistente.

O modo de ação dos branqueadores ópticos como potencializadores não é totalmente elucidado. O aumento da atividade viral parece estar relacionado à intensidade de fluorescência dos branqueadores ópticos, sendo que, quanto maior a fluorescência, maior a afinidade com quitina e mais significativo é o aumento da atividade viral (ARGAUER & SHAPIRO, 1997). A eficiência destes produtos como potencializadores da atividade de entomopatógenos está relacionada aos efeitos destes produtos observados no trato intestinal das lagartas e às alterações na resposta imunológica dos insetos. A resposta imunológica de lepidópteros-pragas depende de barreiras estruturais protetoras contra patógenos (BULET et al., 1999; LEVY et al., 2004; NEGREIRO et al., 2004). A membrana peritrófica de lepidópteros, composta de quitina e proteínas, é uma barreira chave contra a infecção por agentes patogênicos, como vírus e bactérias, devido à sua permeabilidade seletiva (PLYMALE et al., 2008). Branqueadores ópticos atuam inibindo a síntese de quitina na membrana peritrófica, tornando-a mais porosa. Dessa forma a descontinuidade na formação da membrana permite a penetração de maior número de patógenos e tornam a infecção dos tecidos mais rápida e eficiente (WANG & GRANADOS, 2000). Acredita-se que a apoptose seja uma importante defesa celular do hospedeiro lepidóptero, sugerindo que sua inibição possa acelerar a velocidade da infecção (WU et al., 2016). Branqueadores ópticos inibem a apoptose de células do intestino médio de lagartas, tornando assim a ação viral mais eficiente na fase inicial da infecção (WASHBURN et al., 1998; DOUGHERTY et al., 2006). O mesmo não foi observado nas células do intestino médio de lepidópteros infectados com a cepa HD-1 de *B. thuringiensis* (Dipel) e, portanto, não se espera que a inibição da apoptose mediada por branqueadores tenha um efeito na potência das toxinas de *B. thuringiensis* (IBARGUTXI et al., 2008).

Assim, mesmo com resultados opostos encontrados na literatura com outras espécies de lepidópteros, a inclusão de substâncias com atividade semelhante ao branqueador óptico FB 28 em formulações de AgMNPV e *B.*

thuringiensis var. *kurstaki* cepa HD-1 (Dipel); var. *aizawai* GC-91 (Xentari e Agree) com o objetivo de aumentar a eficiência destes produtos pode ser uma opção de uso no controle de população resistente de *A. gemmatalis*, uma vez que o custo deste branqueador impossibilita seu uso como ferramenta de controle em culturas extensivas. Portanto a investigação de substâncias com atividade semelhantes, porém com custo inferior, é um indicativo para novos estudos.

2.6 CONCLUSÃO

A adição de FB 28 (0,1%), no isolado AgMNPV e nos produtos Dipel Xentari e Agree resultou em aumento da mortalidade de lagartas resistentes de terceiro instar, porém o tempo médio de mortalidade das lagartas de *A. gemmatalis* não foi reduzido. FB 28 pode ser uma opção para uso em formulações de bioinseticidas no controle integrado de *A. gemmatalis*. Com os resultados apresentados neste trabalho é possível que empresas, com o objetivo de aumentar atividade dos seus produtos biológicos, busquem substâncias com ação sinérgica semelhante ao FB 28 em concentração igual ou menor, e que novos estudos comecem a serem realizados diretamente no campo.

2.7 REFERÊNCIAS

- ALBERNAZ, K. C.; SILVA-BRANDÃO, K. L.; FRESIA, P.; CÔNSOLI, F. L.; OMOTO, C. Genetic variability and demographic history of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil inferred by mtDNA sequences. **Bulletin of Entomological Research**, v. 102, p. 333-343, 2012.
- ALVES, S. B.; MOINO, JR. A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: Alves S.B. (Ed.). Controle Microbiano de Insetos. **Piracicaba: FEALQ**, p. 217-238, 1998.
- ARGAUER, R.; SHAPIRO M. Fluorescence and relative activities of stilbene optical brighteners as enhancers for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus. **Journal Economic Entomology**, v. 90, p. 416–420, 1997.
- BERNAL, A.; SIMÓN, O.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. Stage-specific insecticidal characteristics of a nucleopolyhedrovirus isolate from *Chrysodeixis chalcites* enhanced by optical brighteners. **Pest Management Science**, v. 70, p. 798-804, 2014.
- BLACK, B.C.; BRENNAN, L.A.; DIERKS, P.M.; GARD, I.E. Commercialization of baculoviral insecticides. In: Miller L.K. (Ed). The Baculoviruses, **New York: Plenum Press**, p. 341–388, 1997.
- BUENO, A. F.; BATISTELA, M. J.; BUENO, R. C. O. F.; FRANÇA-NETO, J. B.; NISHIKAWA, M. A. N.; LIBÉRIO FILHO, A. Effects of integrated pest management, biological control and prophylactic use of insecticides on the management and sustainability of soybean. **Crop Protection**, v. 30, p. 937-945, 2011.
- BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORREA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F.; BUENO, R. C. O. F. Inimigos naturais das pragas da soja. In: HOFFMAN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. Soja: Manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. **Brasília: Embrapa**, p. 493-630, 2012.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.; HOFFMANN D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental and Comparative Immunology**. New York, v. 23, p. 329-344, 1999.

BURR, I.W.; FOSTER, L.A. A test for equality of variances. **University of Purdue**, West Lafayette, IN, USA, 1972.

CISNEROS, J.; PÉREZ, J. A.; PENAGOS, D. I.; RUIZ, J.; GOULSON, D.; CABALLERO, P.; CAVE, R. D.; WILLIAMS, T. Formulation of a nucleopolyhedrovirus with boric acid for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. **Biological Control**, v. 23, p. 87-95, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO Boletim de safra de grãos. **CONAB**, p. 33, 2019

DOUGHERTY, E. M.; NARANG, N.; LOEB, M.; LYNN, D. E. Shapiro M. Fluorescent brightener inhibits apoptosis in baculovirus-infected gypsy moth larval midgut cells in vitro. **Biocontrol Science and Technology**, v. 16, p. 157-168, 2006.

GOULD, F.; ANDERSON, A.; REYNOLDS, A.; BUMGARNER, L.; MOAR, W. Selection and genetic analysis of a *Helicoverpa virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. **Journal of Economic Entomology**, v. 88, p. 1545-1559, 1995.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 701– 726, 1998.

GREENE, G. L. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial mediu. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, p. 488-497, 1976.

HAASE, S.; SCIOCCO-CAP, A.; ROMANOWSKI, V.; Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. **Viruses**, v. 7, p. 2230-2267, 2015.

HERTH, W.; SCHNEPF, E. The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to structural polysaccharide fibrils. **Protoplasma**, v. 105, p. 129-133, 1980.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. Criação massal da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*). **Embrapa-CNPSo**, Documentos 10, p. 20, 1985.

IBARGUTXI, M. A.; MUÑOZ, D.; BERNAL, A.; ESCUDERO, I. R. de; CABALLERO, P. Effects of stilbene optical brighteners on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* and a single nucleopolyhedrovirus on *Helicoverpa armigera*. **Biological Control**, v. 47, p. 322–327, 2008.

JENSEN, C.; NEUMEISTER-KEMP, H.; LYSEK, G. Fluorescence microscopy for the observation of nematophagous fungi inside soil. **Mycologist**, v. 12, p. 107–111, 1998.

LASA, R.; RUIZ-PORTERO, C.; ALCÁZAR, M. D.; BELDA, J. E.; CABALLERO, P.; WILLIAMS, T. Efficacy of optical brightener formulations of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as a biological insecticide in greenhouses in southern Spain. **Biological Control**, v. 40, p. 89-96, 2007.

LEVY, S.M.; FALLEIROS, A. M. F.; GREGÓRIO, E. A.; ARREBOLA, N.R.; TOLEDO L. A. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, p. 633-638, 2004.

LI, X.; YANG, H.; PENG, J.; HONG, H. Studies on synergism and photodegradation of *Bacillus thuringiensis* by fluorescent brighteners in *Helicoverpa armigera* larvae. **Chinese Journal of Biological Control**, v. 2, p. 63–66, 2001.

LUTTRELL, R.; WAN, L.; KNIGHTEN, K. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v.92, p.21-32, 1999.

MANSOUR, N.A.; ELDEFRAWI, M.E.; TOPPOZADA, A.; ZEID, M.; Toxicological studies on the Egyptian cotton leafworm, *Prodenia litura* VI potentiation and antagonism of carbamate insecticide. **Journal Economic Entomology**, v. 59, p. 307-311, 1966.

MARTÍNEZ, A.; CABALLERO, P.; WILLIAMS, T. Effects of an optical brightener on the development, body weight and sex ratio of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 14, p.193-200, 2010.

MOHAN, M.; GUJAR, G.T. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains and commercial formulations to the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). **Crop Protection**, v. 20, p. 311-316, 2001.

MORALES, L.; MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D. R., PARO, F. E.; SOLDORIO, I. L. Fluorescent brighteners improve *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) activity on AgMNPV-Susceptible and resistant strains of the insect. **Biological Control**, v. 20, p. 247–253, 2001.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: Alves S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. **Piracicaba: FEALQ**, p. 509-539, 1998.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Reviews of Entomology**, v. 44, p. 257–89, 1999.

NEGREIRO, M. C. C.; ANDRADE, F. G.; FALLEIROS, A. M. F. Sistema imunológico de defesa em insetos: Uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, p. 293–308, 2004.

OKUNO, S.; TAKATSUKA, J.; NAKAI, M.; OTOTAKE, S.; MASUI, A.; KUNIMI, Y. Viral enhancing activity of various stilbene-derived brighteners for a *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. **Biological Control**, v. 26, p. 146-152, 2003.

PINTILIE, M. **Competing risks**: a practical perspective. Chichester: Wiley, 226 p., 2006.

PHYLLIS, A.W. A stilbene optical brightener can enhance bacterial pathogenicity to gypsy moth (Lepidoptera: Limntriidae) and colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 14, p. 375–383, 2004.

PLYMALE, R.; GROVE, M. J.; COX-FOSTER, D.; OSTIGUY, N.; HOOVER, K. Plant mediated alteration of the peritrophic matrix and baculovirus infection in lepidopteran larvae. **Journal Insect Physiology**, v. 54, p. 737–749, 2008.

REDDY, N. P.; KHAN, A.; AKBAR, P.; DEVI, K. U.; VICTOR, J. S.; SHARMA, H. C. Assessment of the suitability of tinopal as an enhancing adjuvant in formulations of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Pest Management Science**, v.64, p. 909-915, 2008.

ROSSI-ZALAF, L.S.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; SILVEIRA NETO, S.; TANZINI, M.R. Interação de microorganismo com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: Alves S.B., Lopes R.B. (Eds) Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. **Piracicaba: Fealq**, p. 279– 302, 2008.

SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R. M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, p. 283-300, 2011.

SHAPIRO, M. Enhancement in activity of homologous and heterologous baculoviruses infectious to beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) by an optical brightener. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 572-576, 2000.

SHAPIRO, M.; BELL, R. A. Enhanced effectiveness of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus formulated with boric acid. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 75, p. 346-349, 1982.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M.B.; An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, p. 591-611, 1965.

SHEPPARD, C.; SHAPIRO, M.; Physiological and Nutritional effects of a fluorescent brightener on nuclear polyhedrosis virus-infected *Lymantria dispar* (L.) larvae (Lepidoptera: Lymantriidae). **Biological Control**, v. 4, p. 404–411, 1994.

SOSA-GÓMEZ, D. R. Intraspecific variation and population structure of the Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Insecta:

Lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 378-384, 2004.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; OMOTO, C. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. In: HOFFMAN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-praga. **Brasília: Embrapa**, p. 673–724, 2012.

STONE, T.; SIM, S.; MARRONE, P. Selection of tobacco budworm to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* containing the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 53, p. 228-234, 1989.

TSUJI, T.; KAWASAKI, Y.; TAKESHIMA, S.; SEKIYA, T.; TANAKA, S. A new fluorescence stain assay for visualizing living microorganisms in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3415–3421, 1995.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. **Insect Biochemical Molecular Biology**, v. 30, p. 135–143, 2000.

WASHNURN, J. O., KIRKPARICK, B.A.; HAAS-STAPELTON, E.; VOLKman, L. E. Evidence that the stilbene-derived optical brightener M2R enhances *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus infection of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens* by preventing sloughing of infected midgut epithelial cells. **Biological Control**, v. 11, p. 58– 69, 1998.

WU K.; YANG B.; HUANG W.; DOBENS L.; SONG H.; LING, E. Gut immunity in lepidopteran insects. **Developmental and Comparative Immunology**, 64, p. 65-74, 2016.

YANO, S. A. C.; SANTANA, G. K. S.; NEIVA, M. M.; MOSCARDI, F.; MARTINELLI, S.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Tolerância de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, *Pseudoplusia includens* (Walker) e *Rachiplusia nu* (Guenée) à proteína Cry1Ac. In: Congresso Brasileiro de soja. Anais, **Brasília, DF: Embrapa**, 2012.

ZAMORA-AVILÉS, N.; ALONSO-VARGAS, J.; PINEDA, S.; ISAAC-FIGUERIA, J.; LOBIT, P.; MARTÍNEZ-CASTILHO, A. M. Effects of a nucleopolyhedrovirus in

mixtures with azadirachtin on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and viral occlusion body production. **Biocontrol Science and Technology**, v. 23, p. 521-534, 2013.

ZHU, R.; LIU, K.; PENG, J.; YANG, H.; HONG, H. Optical brightener M2R destroys the peritrophic membrane of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Pest Management Science**, v. 63, p. 296-300, 2007.

CAPÍTULO 3: DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae) PROVENIENTES DE REGIÕES PRODUTORAS DE SOJA NO BRASIL

3.1 RESUMO

Neste estudo foram utilizados nove pares de locos microssatélites para avaliar a diversidade e estrutura genética de cinco populações de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae) nas principais regiões produtoras de soja do Brasil (Bahia, Goiás, Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul). Foram analisados um total de 134 alelos em 155 indivíduos. A heterozigosidade observada (H_o) global foi menor do que a heterozigosidade média esperada (H_e) global. Ocorreu desvio nas proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg para todas as populações amostradas. A maior diversidade genética foi encontrada dentro das populações e o índice de diferenciação genética (F_{ST}) foi moderado. Correlação entre distâncias geográficas e distâncias genéticas foi negativa, porém não significativa. Valores positivos e significativos do coeficiente de endogamia (F_{IS}) foram encontrados para a maioria das populações. Não foi verificado efeito de gargalo recente nas populações amostradas. As populações não encontram-se estruturadas e apresentam taxa de fluxo gênico entre elas. Os resultados mostraram que as populações de *A. gemmatalis*, necessitam de programas de manejo, pois, informações da diversidade genética podem contribuir para um melhor entendimento da espécie e para o planejamento de ações futuras para implementação de programas de manejo integrado de pragas (MIP), uma vez que, o fluxo gênico pode disseminar características de maior adaptabilidade, particularmente alelos de resistência. Esse estudo também enriquece a biblioteca de microssatélites com a construção e validação de nove primers para *A. gemmatalis*.

Palavras-chave: Lagarta-da-soja, Manejo de resistência, Genética de populações, SSR.

ABSTRACT

In this study, nine pairs of microsatellite loci were used to evaluate the diversity and genetic structure of five populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae) in the main soybean producing regions of Brazil (Bahia, Goiás, Mato Grosso, Paraná and Rio Grande southern). A total of 134 alleles were analyzed in 155 individuals. The observed global heterozygosity (H_o) was less than the expected average global heterozygosity (H_e). There was a deviation in the proportions of the Hardy-Weinberg equilibrium for all sampled populations. The greatest genetic diversity was found within populations and the genetic differentiation index (F_{ST}) was moderate. Correlation between geographical and genetic distances was negative, but not significant. Positive and significant values of the inbreeding coefficient (F_{IS}) were found for most populations. There was no recent bottleneck effect in the sampled populations. The populations are not structured and have a gene flow rate between them. The results showed that the populations of *A. gemmatalis*, need management programs, since information on genetic diversity can contribute to a better understanding of the species and planning future actions for the implementation of integrated pest management (IPM) programs, once, gene flow can disseminate features of greater adaptability, specially resistance alleles. This study also enriches the microsatellite library with the construction and validation of nine primers for *A. gemmatalis*.

Keywords: Soybean caterpillar, Resistance management, Population genetics, SSR.

3.2 INTRODUÇÃO

Anticarsia gemmatalis Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae) é considerada uma das pragas de maior prevalência na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill), sendo amplamente distribuída e causando perdas na produção em todas as áreas onde a leguminosa é cultivada (SOSA-GÓMEZ et al., 2004). A lagarta-da-soja é um inseto nativo e restrito às áreas tropicais e subtropicais do continente americano (FORD et al., 1975), podendo consumir até 100% das folhas das plantas (GAZZONI & MOSCARDI, 1998; HOFFMANN CAMPO et al., 2000).

No Brasil, *A. gemmatalis* está presente em todas as regiões produtoras de soja, sendo, no Paraná, a praga mais frequente no decorrer da safra de 2019/2020, com predominância de 68% (CONTE et al., 2020). E, uma vez que a dinâmica populacional e ecologia deste inseto variam entre regiões dentro de determinadas faixas de distribuição, pelo fato de ser uma espécie migratória e sobreviver em hospedeiros alternativos (HERZOG & TODD, 1980), o controle desta praga, até a introdução da soja Bt, foi realizado, principalmente, com o uso de inseticidas sintéticos. A introdução da soja transgênica, com o gene sintético Cry1Ac, no mercado brasileiro, tornou-se uma alternativa importante para a diminuição de aplicações de inseticidas químicos (RAHMAN et al., 2007), que hoje ocupa uma área de, aproximadamente, 65% da área total cultivada com soja (SPECHT et al., 2021). No entanto, o uso, ainda, recorrente desses inseticidas e a disponibilidade da toxina Cry1Ac em grandes áreas cultivadas trouxeram preocupações quanto à seleção de fenótipos resistentes (GOULD, 1998). Para Georghiou (1983), a aplicação de inseticidas com modo de ação semelhante, antes que populações alcancem o nível de dano econômico, está entre os fatores mais comuns no desenvolvimento de resistência, a qual pode ser agravada com o isolamento geográfico, uma vez que este pode funcionar como uma barreira ao fluxo gênico, reduzindo, por consequência, a probabilidade de introdução de alelos de suscetibilidade nas populações. Por outro lado, a ocorrência de fluxo gênico pode distribuir variantes alélicas de suscetibilidade entre as populações, reduzindo a probabilidade de seleção de linhagens resistentes (GUSE et al., 2002), ou podem transmitir alelos de resistência e aumentar o número de insetos resistentes. Estes podem estimar o

grau de isolamento e a troca de material genético entre populações, ao longo do espaço e do tempo, fornecendo uma estimativa da taxa de invasão ou re-invasão de determinada área, e ainda inferir linhagens diferenciadas e isoladas que ocupam diferentes culturas (MARTEL et al., 2003)

Sabendo que a diversidade genética dentro de populações é uma condição fundamental para que a evolução ocorra, para os insetos, como é o caso de *A. gemmatalis*, a existência de diversidade genética entre e dentro de populações, implicam em um processo inevitável de seleção de pragas mais adaptadas ao ambiente, possibilitando que os indivíduos possam superar as medidas de controle (GOULD, 1988ab, 1991), uma vez que, dependendo da taxa de dispersão e do genótipo dos indivíduos imigrantes, pode ocorrer o aumento da frequência dos alelos de resistência ou a diluição destes alelos em uma população de insetos (CAPRIO & TABASHNIK, 1992). Desta maneira, estudos voltados para a estimativa dos índices de diversidade e estrutura genética de *A. gemmatalis* se fazem relevantes na determinação de estratégias de manejo de resistência, podendo contribuir, significativamente, para a manutenção da suscetibilidade da espécie a métodos de controle (químico e/ou biológico).

A caracterização genética de populações geográficas de *A. gemmatalis*, além de evidenciar os clusters genéticos existentes, também permitiu inferir as taxas de fluxo gênico entre as populações (SOSA-GÓMEZ et al., 2004). Dentre os marcadores moleculares utilizados em estudos populacionais, os marcadores microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) mostram-se altamente eficazes para este propósito, visto que são multi-alélicos e amplamente distribuídos no genoma, promovendo, assim, resolução adequada para estudos de variabilidade intraespecífica (OLIVEIRA et al., 2006). Por essa razão, tais marcadores estão entre os mais utilizados em estudos que estimam a estrutura e diversidade genética de populações de diferentes organismos, especialmente, os de importância agrícola (CHEN & DORN, 2010; CHAPUIS et al., 2011; DOMINGUES et al., 2012; FONTES et al., 2012; PAVINATO et al., 2013; KIRK et al., 2013; VALLE et al., 2013; HUSCH et al., 2018).

Assim, considerando a escassez de informações genético-populacionais para a espécie, e a importância agrícola que possui, foram analisados nove loci de microssatélites em cinco populações de *A. gemmatalis*, com o objetivo de

estimar a diversidade e estrutura genética, além do fluxo gênico. As informações obtidas com esse estudo serão fundamentais para a compreensão da dinâmica populacional da espécie e, servirão de base para o desenvolvimento de estratégias de manejo desta praga.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Amostragem

Populações de *A. gemmatalis*, provenientes de cinco localidades do Brasil (**Tabela 1**), foram coletadas em campos com produção de soja, no estágio adulto, sendo que para cada localidade, foram separados em média 32 indivíduos para extração de DNA.

Tabela 1. Localização, código e tamanho amostral (n) de cinco populações de *Anticarsia gemmatalis*.

População	Data	Código	Coordenadas	Altitude	n
Luís Eduardo Magalhães (Faz. Triunfo), Bahia - Brasil	Jan/2009	[LemBA]	11°58'39.6"S 46°00'24.9"W	682 m	32
Novo São Joaquim (Faz. Cristalina), Mato Grosso - Brasil	Dez/2008	[NsJMT]	15°03'27.3"S 53°22'02.6"W	569 m	32
Morrinhos, Goiás - Brasil	Jan/2010	[MoGO]	17°42'17.3"S 49°08'35.0"W	686 m	27
Londrina (Distrito da Warta), Paraná - Brasil	Dez/2017 Jan/2018	[LonPR]	23°11' 17.4"S 51°10'59.6"W	509 m	32
Cruz Alta, Rio Grande do Sul – Brasil	Dez/2010 Jan/2011	[CaRS]	28°38'40.0"S 53°38'15.8"W	490 m	32

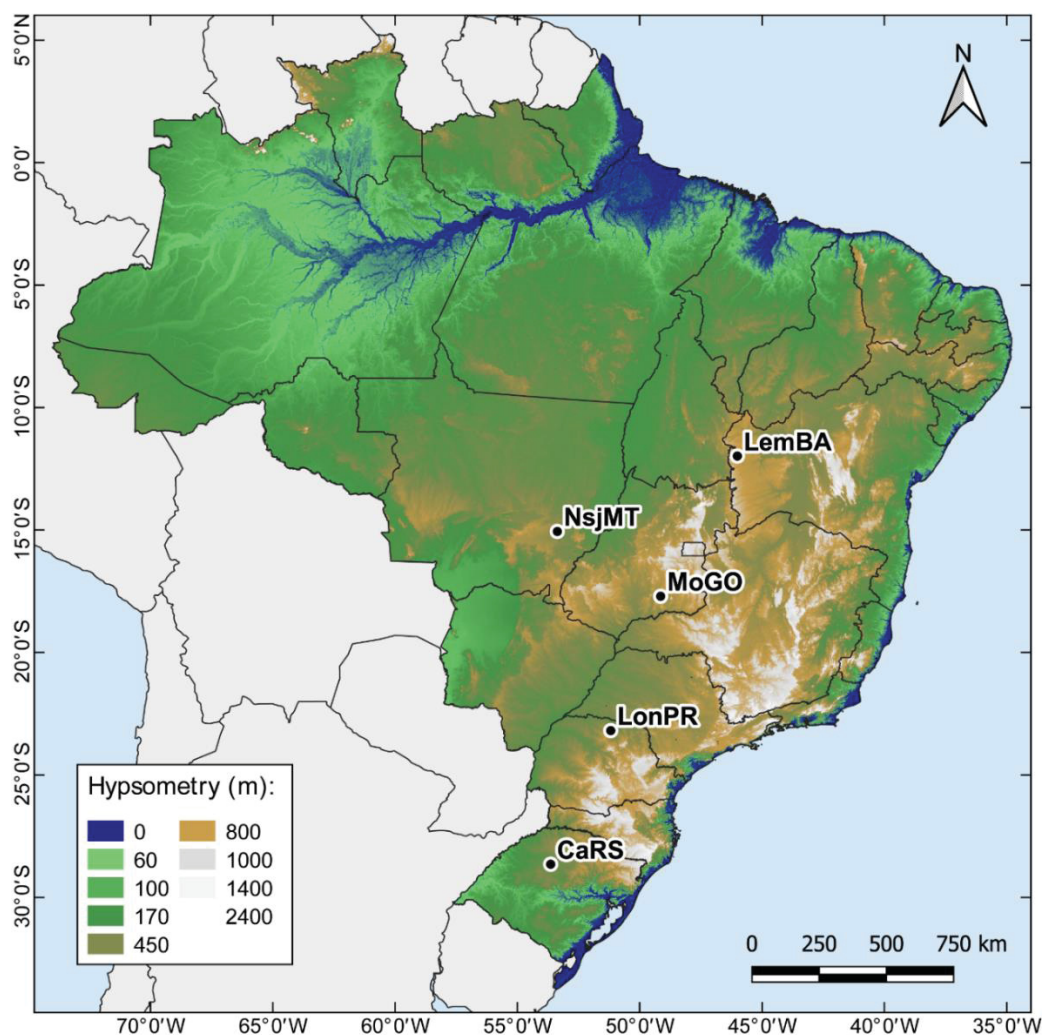


Figura 1. Localização das cinco populações de *Anticarsia gemmatalis* amostradas em regiões produtoras de soja do Brasil.

3.3.2. Prospecção *in silico* e desenho dos primers microssatélites

Para obtenção de primers específicos para regiões microssatélites a serem utilizados neste estudo, foram acessados dados de transcriptomas de espécimes suscetíveis e resistentes à Cry1Ac de *A. gemmatalis*, coletados no Brasil, disponíveis no banco de dados NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*) (números de acesso: PRJNA308354 e PRJNA387150).

O transcriptoma sob número de acesso PRJNA308354 foi baixado e montado, utilizando o software Trinity versão 2.8.4 (GRABHERR et al., 2011), enquanto os dados disponíveis para o acesso PRJNA387150 precisaram passar por trimagem. Assim, para realizar a análise, o acesso PRJNA387150 foi obtido

por meio de download de vários arquivos FastQ (números de acesso: SRX7178191, SRX7178337, SRX7178365, SRX7178453, SRX7178783, SRX7179013, SRX2981932, SRX2981933, SRX2981934, SRX2981935, SRX2981936 e SRX2981937), os quais foram trimados com o auxílio do Trimmomatic versão 0.36 (BOLGER et al., 2014) e, em seguida, dois transcriptomas foram montados, utilizando o software Trinity versão 2.8.4 (GRABHERR et al., 2011).

Os três transcriptomas foram, então, submetidos a uma varredura para detecção de sequências curtas repetidas em tandem (1 a 6 nt), com a utilização da ferramenta MISA (THIEL et al., 2003). Os pares de primer que flanqueiam os elementos de repetição foram desenhados pelo software Primer3 (UNTERGASSER et al., 2012).

3.3.3 Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico de *A. gemmatalis* foi obtido por meio do protocolo de Rogers e Bendich (1988), com algumas modificações. Foram usadas apenas a cabeça e as pernas de cada indivíduo adulto para evitar possível contaminação (SOSA-GÓMEZ et al., 2002). A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, conduzida em tampão TBE 1X, a 120V por 1 hora. Após a corrida, o gel foi corado com 10 mg.ml⁻¹ de brometo de etídio e visualizado em transiluminador L-PIX- ST e L-PIX IMAGE 7.1 M Pixel, no programa de captura de imagem L-PIX IMAGE 1.0.1 (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP). A concentração do DNA foi estimada por espectrômetro Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) e as amostras diluídas para a concentração de 10 ng/μl.

3.3.4 Amplificação e Eletroforese Capilar

Após a varredura dos transcriptomas de *A. gemmatalis*, foram desenhados 41 pares de primers, dos quais nove apresentaram amplificação satisfatória (**Tabela 2**), sendo, portanto, aplicados a 155 indivíduos adultos da espécie.

As amplificações dos nove loci SSR foram conduzidas de acordo com a metodologia proposta por Schuelke (2000), cuja marcação dos fragmentos com fluoróforos, para posterior resolução por eletroforese capilar automatizada, é realizada durante a própria reação de PCR. Para esse propósito, foi adicionado à extremidade 5' de cada um dos primers forward uma cauda M13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'). A mesma sequência M13 foi sintetizada e marcada com quatro fluorescências distintas, 6-FAM, VIC, NED e PET.

As reações de amplificação foram ajustadas para um volume final de 10 µl contendo 4,5 µl de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI), 0,10 µl de primer forward (10 pM), 0,40 µl de primer reverse (10 pM), 0,40 µl de primer M13 (5 pM), marcado com um dos fluoróforos (6-FAM, VIC, NED, PET), 0,40 µl de DMSO (dimethylsulphoxide), 4 µl de DNA (10 ng/µl) e 0,20 µl de água livre de nucleases. As condições de ciclagem foram as mesmas para cada um dos primers utilizados, sendo constituídas de uma desnaturação inicial a 95°C for 4 min; 15 ciclos de 94 °C for 30 s, 65 °C for 30 s e 72 °C for 30 s, com decréscimo de 1 °C na temperatura de anelamento por ciclo; 30 ciclos de 94 °C for 30 s, 50 °C for 30 s, e 72 °C por 30 s; e uma extensão final a 72 °C por 15 min.

Para otimizar a eletroforese capilar, as amostras amplificadas, provenientes de cada par de primer marcado com uma das fluorescências (6-FAM, VIC, NED e PET), foram combinadas em um único mix, composto por 2 µl de PCR de cada. Em seguida, 1 µl do mix, contendo quatro primers, foi adicionado a 0,2 µl de marcador de peso molecular GS-600 LIZ (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 8,8 µl de formamida HI-DI (Applied Biosystems, Foster City, CA) para ser submetido à eletroforese capilar em sistema automatizado ABI 3500 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os eletroferogramas gerados foram analisados e os alelos determinados manualmente com o auxílio do software GeneMarker versão 2.6.3 (SoftGenetics, State College, PA).

Tabela 2. Lista de primers microsatélites utilizados para a estimativa de parâmetros genético-populacionais de *Anticarsia gemmatalis*, com temperatura de anelamento (Tm), comprimento dos fragmentos gerados em pares de base e conteúdo de informação polimórfica (PIC).

Locus	Sequência do primer	Motif	Tm(°C)	Tamanho (pb)	PIC
Agem619	F: CTGAACAAACTGTCACACGCA R: GCTCGTAGGAACAATCGACG	(CA)8n(CA)8	50	149 – 181	0,88
Agem621	F: ACAGTCGCAGATGTCGTTGA R: AGACCTCATATACTTTGGTCATCACT	(GAT)5	50	333 – 369	0,56
Agem633	F: TGGGTTTTGTGCAATGAGTTGT R: ATCTATTGAGCAGTTAAGCTACCT	(TG)11	50	109 – 141	0,76
Agem647	F: ACTTGTTCAACCGCATGCAC R: GAGAACAGCTTGGCCACCTC	(GT)11	50	135 – 177	0,51
Agem651	F: AGATGTTCTCGTGTCCACACCC R: ACACGAATCACTGAGTCAAAGGA	(AC)13	50	272 – 304	0,85
Agem661	F: GCTCGAACAGTCACAGGGAA R: AGGTACACTTACAGTCACATTTTCA	(AT)7	50	151 – 299	0,91
Agem673	F: GGACATGACTTCCGCAGACA R: TCATCCCCCTCACTCCGCTAT	(AC)8	50	286 – 324	0,77
Agem685	F: TCGTCTAAATCAGTGAAGATCTCTAA R: GCGCTTCCTTTGATAGCACG	(TA)6	50	173 – 193	0,61
Agem695	F: ACCAATAGAGGCGTTAGTTCA R: GCATTTGTTTTGTTTGAGCGC	(AAC)6	50	175 – 298	0,76

3.3.5 Análise Estatística

3.3.5.1 Diversidade e estrutura genética de populações

Para verificar o poder de discriminação dos loci de microsatélites utilizados, uma curva de acumulação genotípica com 1.000 iterações foi realizada e plotada no ambiente R v. 4.0.1 (R Core Team, 2020) com o pacote “poppr” (KAMVAR et al., 2014; KAMVAR et al.; 2015). O mesmo pacote foi utilizado para calcular o total de dados faltantes. Para estimar a presença de alelos nulos, foi utilizado o software FreeNA (CHAPUIS & ESTOUP, 2007).

Os números de alelos (A), riqueza alélica (R_A) rarefeita, heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada (H_E) (diversidade genética; Nei 1987), e coeficiente de endogamia (F_{IS}), para cada população, além do H_O e H_E total, foram estimados utilizando o pacote “hierfstat” (GOUDET & JOMBART, 2020) no ambiente R v. 4.0.1 (R CORE TEAM, 2020). A partir das estimativas de frequências alélicas realizadas por meio do pacote hierfstat, foi inferido o número de alelos privados (A_P) e raros (A_R) nas populações, considerando “raros” alelos com frequência $\leq 0,05$. O número efetivo de alelos (A_E) foi calculado usando a do software Popgene versão 1.31 (YEH et al., 1999).

Para verificar desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg, para todas as populações, foi utilizado o teste exato de Fisher, calculado pelo pacote “Genepop'007” (ROUSSET, 2008), implementado no ambiente R v. 4.0.1 (R CORE TEAM, 2020), utilizando parâmetros padrão da cadeia de Markov (10.000 “step dememorization”, 20 “batches”, e 5.000 “iterations per batch”). Também o pacote Pegas v 0.8.1 (Paradis 2010), foi utilizado para estimar desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg, para cada locus em todas as populações, sendo a significância do teste verificada pelo método de Monte Carlo baseado com 10.000 permutações. O pacote “poppr” (KAMVAR et al., 2014; KAMVAR et al., 2015) foi utilizado para calcular o índice de associação padronizado (r_{barD}), o qual verifica a presença de desequilíbrio de ligação entre todos os loci. Para determinar a significância dos índices, foram estimados os intervalos de 95 % de confiança, a partir de 10.000 permutações.

A análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992) foi realizada para estimar o particionamento da variância genética dentro e entre as

populações de *A. gemmatalis* no software Arlequin 3.5.1.3 (EXCOFFIER et al., 2005). Com base na AMOVA, foram estimados os índices F_{ST} global e par a par (WEIR & COCKERHAM, 1984), no mesmo software. O F_{ST} global foi estimado, ainda, por meio do método ENA (Excluding Null Alleles) implementado no software FreeNA (CHAPUIS & ESTOUP, 2007). O método ENA estima valores de F_{ST} a partir de dados corrigidos para o viés induzido pela presença de alelos nulos nas inferências de estruturação populacional.

Como forma de verificar o número de possíveis agrupamentos genéticos existentes na amostragem, foi realizada uma análise Bayesiana de agrupamento no software Parallel Structure 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000; BESNIER & GLOVER, 2013) disponível no portal CIPRES v.3.3 (MILLER et al., 2010). Foram realizadas 20 corridas independentes para valores de $K = 1$ até $K = 8$, seguindo o modelo de mistura (admixture) e sem “prior” de localização das populações. Cada corrida teve um burn-in de 250.000 iterações na Cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMC), seguido por 1.000.000 iterações. O número de clusters (melhor K) foi determinado pelo método de Evanno (EVANNO et al., 2005), implementado no software CLUMPAK (KOPELMAN et al., 2015). O software Clumpak foi utilizado, ainda, para sumarizar e gerar o gráfico de barra resultante das iterações realizadas para o melhor K .

Como forma de visualizar as relações filogenéticas entre as populações de *A. gemmatalis*, foi construída uma Neighbor-Net (BRYANT & MOULTON 2004), a partir da distância de Prevosti (PREVOSTI et al. 1975), a qual foi escolhida por sua eficiência quando na presença de dados faltantes (HANSEN et al., 2016; KAMVAR et al., 2015). A matriz de distância par a par, entre indivíduos, foi calculada no pacote “poppr” (KAMVAR et al., 2014; KAMVAR et al., 2015), e a Neighbor-Net construída pelo software SplitsTree v.4.14.2 (HUSON & BRYANT, 2006). A partir da matriz de distância para a par de Prevosti, foi realizada, também, uma Análise de Coordenadas Principais (PCoA), por meio da função “cmdscale” do R v. 4.0.1 (R CORE TEAM, 2020).

Para verificar a possível correlação entre as distâncias genéticas e geográficas das populações, foi realizado o teste de Mantel implementado por Legendre e Legendre (2012). A matriz de F_{ST} par a par foi construída no Arlequin 3.5.1.3. (EXCOFFIER et al., 2005), enquanto a matriz de distância geográfica foi obtida por meio do software QGIS 2.14.0 (QGIS DEVELOPMENT TEAM, 2016).

O coeficiente de correlação de Mantel (r) foi calculado pelo método Pearson, usando o pacote “Vegan” (OKSANEN et al., 2016) implementado no ambiente R v. 4.0.1 (R CORE TEAM, 2020), sendo a significância avaliada por meio de 10.000 permutações.

3.3.5.2 Análise demográfica e fluxo gênico

Com base em nove loci SSR, a história demográfica das populações de *A. gemmatilis* foi avaliada pelo teste estatístico Wilcoxon, utilizando o programa BOTTLENECK v.1.2.02. (PIRY et al., 1999). O teste de Wilcoxon examina se as populações exibem um maior nível de heterozigosidade do que o previsto em uma população em equilíbrio de mutação-deriva e foi escolhido por trazer estimativas mais acuradas, quando o conjunto de dados possui menos de 20 loci (PIRY et al., 1999). Foram realizadas 10.000 simulações com 95% de mutações em passo único e 5% de mutações em múltiplos passos e uma variância de 12, conforme recomendado por Piry et al. (1999). Apesar do modelo mutacional Two-Phase Mutational Model (TPM) ser mais apropriado para dados de microsatélites, o Modelo Infinite Alleles Model (IAM) e Stepwise Mutation Model (SMM) também foram testados. Os P-valores do teste de Wilcoxon foram usados como evidência para os gargalos e foram avaliados quanto à significância no nível 0,05.

O fluxo gênico contemporâneo e a direção da migração entre as populações foram estimados por meio de abordagem Bayesiana, implementada no software BayesAss v3 (BA3) (WILSON & RANNALA, 2003). Inicialmente, foram utilizados parâmetros padrão de corrida para verificar a necessidade de ajuste. Em seguida, os valores dos parâmetros de mistura MCMC da taxa de migração ($-m$), frequência alélica ($-a$) e coeficiente de endogamia ($-f$) foram ajustados ($-m0,15$; $-a0,40$; $-f0,4$) para obter as taxas de aceitação ótima para mudanças propostas entre as cadeias no final da corrida (entre 40 % e 60 % do comprimento total da cadeia) (WILSON & RANNALA, 2003). Após obtidas as taxas de aceitação ótima, foram realizadas duas corridas independentes com 100.000.000 iterações MCMC cada, com burn-in de 10.000.000, sendo

amostradas a cada 500 interações. A convergência das corridas foi verificada no software Tracer v.1.6 (RAMBAUT et al. 2014).

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Diversidade e Estrutura Genética

Os resultados mostram que dos 41 locos disponíveis, nove mostraram boas condições de amplificação e ótimos níveis de polimorfismo, tendo sido suficientes para discriminar 100% dos genótipos multilocus únicos presentes na amostragem, como pode ser observado pela curva de acumulação genotípica (**Figura 2**). Os locos Agem619 e Agem661 apresentaram maiores valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC), enquanto os locos Agem621 e Agem647 apresentaram as menores valores (**Tabela 2**).

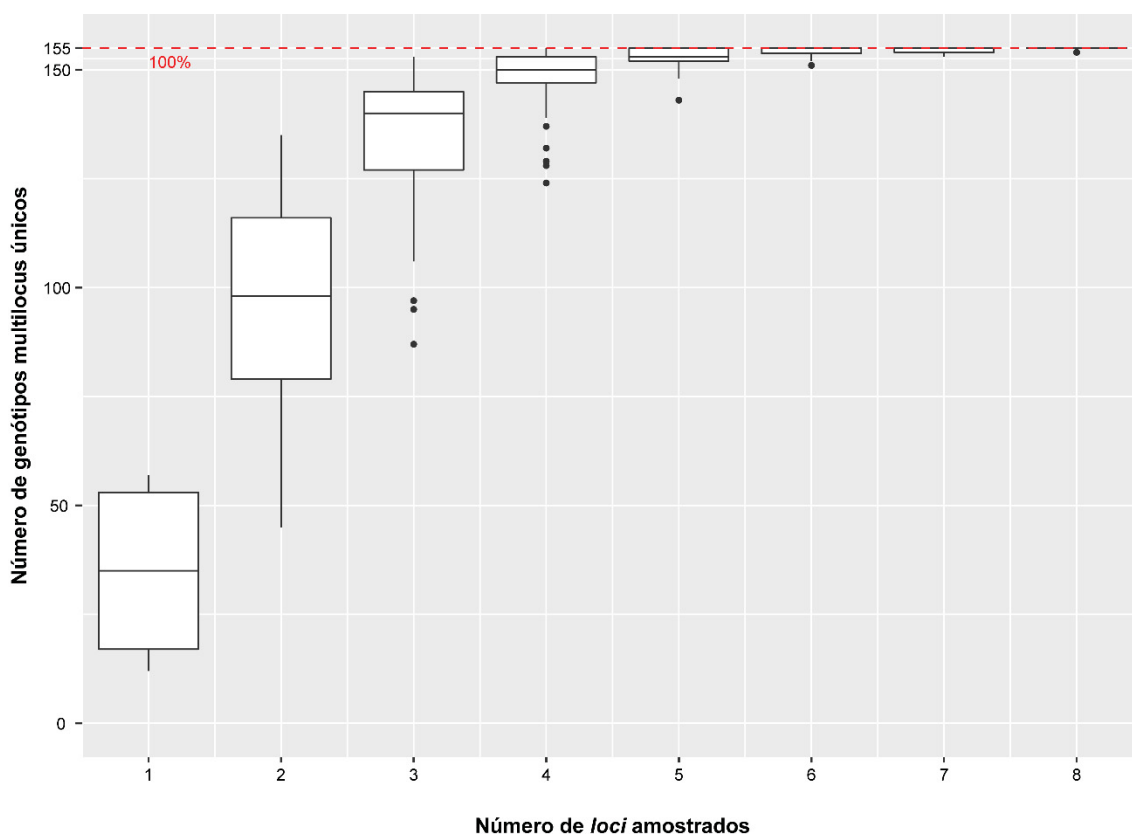


Figura 2. Curva de acumulação genotípica para nove *loci* microsatélites aplicados a cinco populações de *Anticarsia gemmatilis*. A formação de um platô

na curva mostra a eficiência dos marcadores utilizados em discriminar os genótipos multilocus únicos que compõem a amostragem.

Para os nove locos de SSR utilizados em *A. gemmatalis*, foi observado um total de 134 alelos em 155 indivíduos que foram amostrados nas cinco populações. Os locos apresentaram grande número de alelos entre as populações, variando de 60 (NsjMT) a 87 (MoGO), com uma média de 72 alelos por população. Já o número de alelos efetivos (A_e) variou de 3,37 (LemBA) a 5,31 (MoGO). O número de alelos privados (A_p), ou seja, exclusivos de determinada população, variou de 4 (LemBA) a 18 (MoGO) (**Tabela 3**). O número de alelos raros (A_r) foi relativamente alto, variando de 23 (NsjMT e CaRS) a 45 alelos (LonPR) com média de 32,2. A riqueza alélica (R_a), por sua vez, variou de 6,37 (NsjMT) a 9,63 (LonPR), com média de 7,77 entre as populações. A heterozigosidade observada (H_o – 0,48) global foi menor do que a heterozigosidade esperada (H_e – 0,68) global. A heterozigosidade observada apresentou variação entre 0,44 (LemBA) a 0,54 (NsjMT), enquanto que a heterozigosidade esperada ficou entre 0,62 (NsjMT) e 0,75 (MoGO) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Parâmetros intrapopulacionais de diversidade genética de *Anticarsia gemmatalis*, estimados a partir de nove *loci* de SSR.

População	n	A	R_A	A_E	A_R	A_P	H_E	H_O	F_{IS}	rBarD
LemBA	32	63	6,72	3,37	31	4	0,63	0,44*	0,30†	0,01
NsjMT	32	60	6,37	3,50	23	6	0,62	0,54*	0,12	0,03
MoGO	27	87	9,63	5,31	39	18	0,75	0,50*	0,33†	0,02
LonPR	32	86	9,04	4,79	45	15	0,70	0,45*	0,35†	0,00
CaRS	32	66	7,10	3,99	23	6	0,70	0,44*	0,37†	0,02
Média	31	72	7,77	4,19	32,20	9,80	0,68	0,48	–	

n = número de indivíduos genotipados; A = número de alelos; R_A = riqueza alélica; A_E = alelos efetivos; A_R = alelos raros; A_P = alelos privados; H_E = heterozigosidade esperada; H_O = heterozigosidade observada; F_{IS} = coeficiente de endogamia; rBarD = índice padronizado de associação, utilizado para verificar a presença de desequilíbrio de ligação entre os *loci*.

*Desvio significativo do Equilíbrio de Hardy–Weinberg ($P < 0,01$, calculado a partir de 5.000 interações na cadeia de Markov).

†Valores cujo intervalo de 95 % de confiança não se sobrepõe ao zero (calculado a partir de 10.000 permutações).

Com exceção de Mato Grosso (NsjMT) com $F_{IS} = 0,12$, todas as outras populações apresentaram valores significativos para o índice de endogamia F_{IS} . Da mesma forma, desvios significativos ($P < 0,001$) do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foram observados para todas as populações, variando de quatro (NsjMT e MoGO) a cinco (LemBA, LonPR e CaRS) locos de SSR por população (**Tabela 3**).

A presença de alelos nulos foi calculada pelo software *FreeNa*, e apontou que os locos agem 621 e agem 696 foram os que apresentaram maior frequência de alelos nulos em todas as populações de *A. gemmatilis* com média de 0,22 e 0,29, respectivamente. A menor frequência de alelos nulos foi observada em Agem633 com média 0,03, seguido por Agem 661 (0,05). A média de alelos nulos foi maior para as populações CaRS (0,15) e LemBA (0,14), com MoGo e LonPR apresentaram o mesmo valor (0,13) e NsjMT com a menor frequência (0,07) (**Tabela 4**).

Tabela 4. Frequências de alelos nulos para nove *loci* de SSR em cinco populações de *Anticarsia gemmatalis*, estimadas pelo software *FreeNA*.

População	Agem619	Agem621	Agem633	Agem647	Agem651	Agem661	Agem673	Agem685	Agem695	\bar{x}
LemBA	0,08	0,13	0,00	0,15	0,30	0,08	0,02	0,18	0,34	0,14
NsjMT	0,00	0,29	0,00	0,03	0,00	0,07	0,00	0,00	0,24	0,07
MoGO	0,01	0,25	0,02	0,24	0,11	0,04	0,15	0,11	0,28	0,13
LonPR	0,03	0,22	0,09	0,18	0,03	0,02	0,12	0,19	0,31	0,13
CaRS	0,03	0,35	0,21	0,26	0,02	0,03	0,01	0,05	0,39	0,15
\bar{x}	0,03	0,22	0,03	0,15	0,11	0,05	0,07	0,12	0,29	

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) apontam uma maior variação genética dentro das populações *A. gemmatalis* (85,96%) do que entre elas (14,04%). O índice de diferenciação populacional, F_{ST} global (0,14), não apresentou diferença do índice $F_{ST}ENA$ (0,13), o qual foi corrigido pelo software *FreeNA*. Ambos índices, indicam que as populações apresentaram nível de diferenciação genética moderado, segundo Hartl & Clark (2006), que consideram valores de F_{ST} menores que 0.05, de 0.05 a 0.15, de 0.15 a 0.25 e acima de 0.25, indicativos de diferenciação genética baixa, moderada, alta e muito alta entre populações, respectivamente (**Tabela 5**).

Tabela 5. Análise da variância molecular estimada a partir de nove *loci* SSR, para cinco populações de *Anticarsia gemmatalis*.

Fonte da variação	g.l.	SQ	CV	PV (%)	F_{ST} global	$F_{ST}ENA$
Entre populações	4	133,35	0,49	14,04*	0,14*	0,13†
Dentro das populações	305	914,56	3,00	85,96*		
Total	309	1047,92	3,49			

g. l. = grau de liberdade; **SQ** = soma dos quadrados; **CV** = componente de variação; **PV (%)** = percentual de variação; **$F_{ST}ENA$** = Índice de fixação corrigido pelo software *FreeNA* para a presença de alelos nulos.

* $P < 0,01$ (significância estimada a partir de 10,100 permutações).

†Intervalo de 95 % de confiança que não se sobrepõe ao zero (calculado a partir de 10.000 permutações).

O teste de Mantel, que verifica a correlação entre as distâncias geográficas e genéticas (F_{ST} par a par), apresentou correlação negativa (-0.20), porém, não significativa (P -valor = 0,70), o que é esperado quando se tem fluxo gênico (**Tabela 6**).

Tabela 6. Distâncias geográficas (Km) e genética (F_{ST}) par a par, estimadas a partir de nove *loci* SSR para cinco populações de *Anticarsia gemmatalis*.

	LemBA	NsjMT	MoGO	LonPR	CaRS
LemBA	–	1.356,52	643,27	652,53	928,83
NsjMT	0,15	–	717,91	2.008,39	866,48
MoGO	0,15	0,15	–	1.295,62	537,98
LonPR	0,15	0,16	0,06	–	1.504,76
CaRS	0,21	0,21	0,09	0,04	–

diagonal superior = Valores de distância geográfica entre pares de populações;

diagonal inferior = valores de distância genética entre pares de populações.

**Todos os valores de F_{ST} par a par são significativos a um $P > 0,01$ (significância estimada a partir de 10,100 permutações).

A inferência bayesiana indicou alto nível de fluxo gênico do estado do Paraná para Mato Grosso, sendo que a estimativa de indivíduos migrantes de LonPR para MoGO foi de 28%, seguido de CaRS em direção a LonPR com 8% e LonPR para CaRS com 3% de migrantes. A maior parte da diversidade genética, nas populações LemBA, NsjMT e CaRS, é resultado de indivíduos não migrantes. Enquanto em MoGO e LonPR os indivíduos migrantes contribuem, relativamente, com a diversidade populacional, tendo essas populações os menores percentuais de indivíduos não migrantes (68% e 88%, respectivamente) (**Tabela 7**).

Tabela 7. Taxas médias de fluxo gênico contemporâneo entre cinco populações de *Anticarsia gemmatalis*, estimadas a partir de nove *loci* SSR, pelo software BayesAss. A proporção de não migrantes se encontra na diagonal em negrito.

Destino do fluxo gênico	Origem do fluxo gênico				
	LemBA	NsjMT	MoGO	LonPR	CaRS
LemBA	0,96	0,01	0,01	0,01	0,01
NsjMT	0,02	0,94	0,01	0,02	0,01
MoGO	0,01	0,01	0,68	0,28	0,02
LonPR	0,01	0,01	0,01	0,88	0,09
CaRS	0,01	0,01	0,01	0,02	0,95

De acordo com a análise realizada pelo Bottleneck, foi observado que, apenas para o modelo IAM encontrou um possível efeito de gargalo genético para a população CaRS de Cruz Alta, RS com valor de $P < 0,01\%$ (**Tabela 8**).

Tabela 8. P -valores do teste de Wilcoxon, para eventos de gargalo genético, estimados pelo software Bottleneck, a partir de nove *loci* SSR em cinco populações de *Anticarsia gemmatalis*.

	IAM^a	TPM^b	SMM^c
LemBA	0,13	0,88	1,00
NsjMT	0,08	0,54	0,92
MoGO	0,02	0,75	1,00
LonPR	0,37	0,98	1,00
CaRS	0,01*	0,33	0,99

^a = modelo evolutivo *Infinite Allele Model*; ^b = modelo evolutivo *Two-Phase Mutational Model*; ^c = modelo evolutivo *Stepwise Mutation Model*. *Valores significativos a um $P < 0,01$ (significância estimada a partir de 10.000 permutações).

A análise de agrupamentos Bayesianos realizada pelo programa *Structure*, indicou que o valor mais provável de K (número de agrupamentos), a partir de delta K (ΔK) foi $K = 2$, sendo o segundo melhor valor de delta K para $K = 4$ (**Figura 3**).

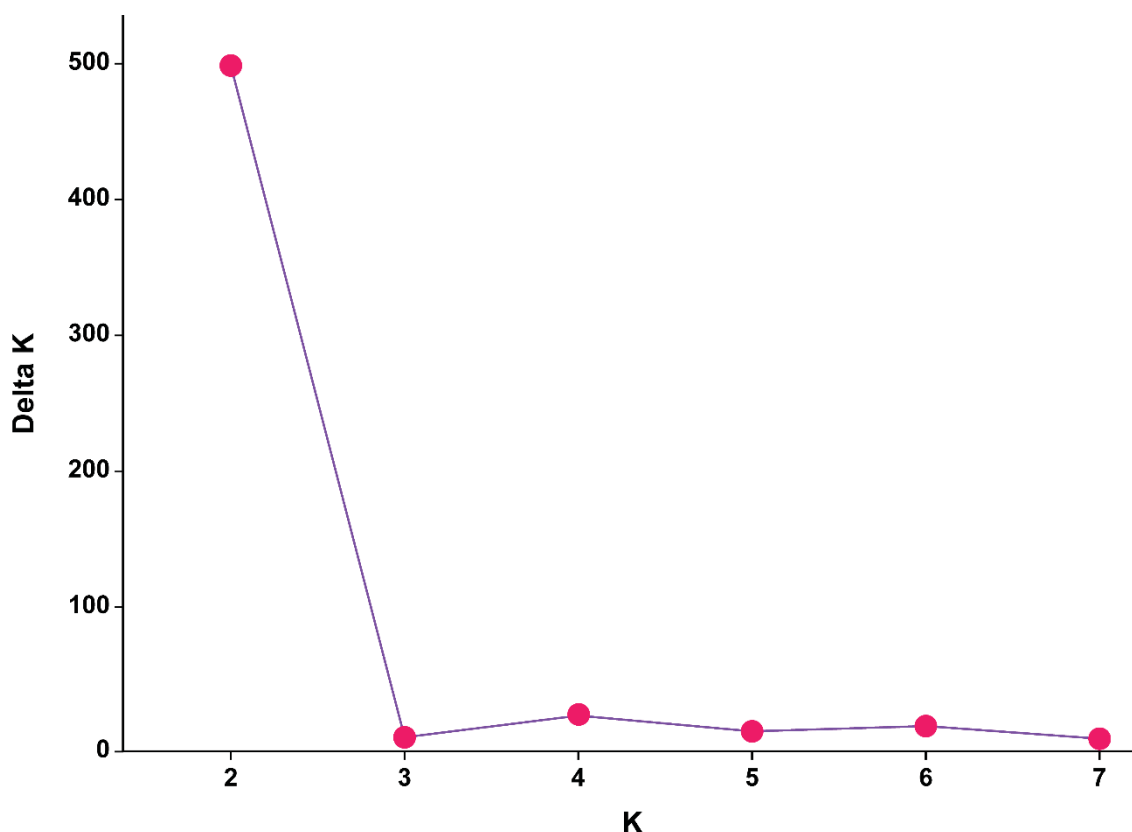
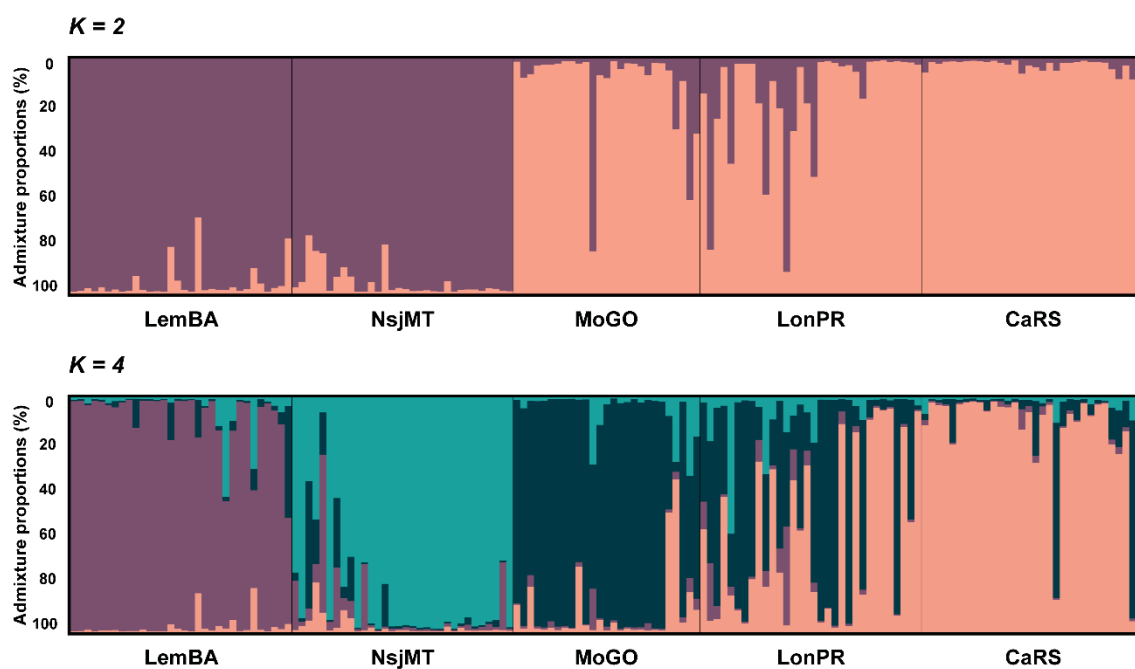


Figura 3. Valores de Delta K (ΔK) estimados pelo *Structure Harvester* para as análises de agrupamento Bayesiano (*Structure*) de populações de *Anticarsia gemmatalis* em cinco estados do Brasil.

Para o $K = 2$, foi formado um cluster composto pelas populações LemBA e NsjMT e um segundo cluster formado por MoGO, LonPR e CaRS, de forma que a população de Cruz Alta (RS) é mais homogênea dentro deste grupo. Para o segundo melhor valor de delta K ($K = 4$) formaram-se quatro grupos: o primeiro cluster formado por LemBA; o segundo cluster formado NsjMT; o terceiro cluster formado por MoGO e LonPR; e um quarto cluster formado por CaRS (**Figura 4**).

A**B****Populações:**

- Luís Eduardo Magalhães [LemBA]
- Novo São Joaquim [NsjMT]
- Morrinhos [MoGO]
- Londrina [LonPR]
- Cruz Alta [CaRS]

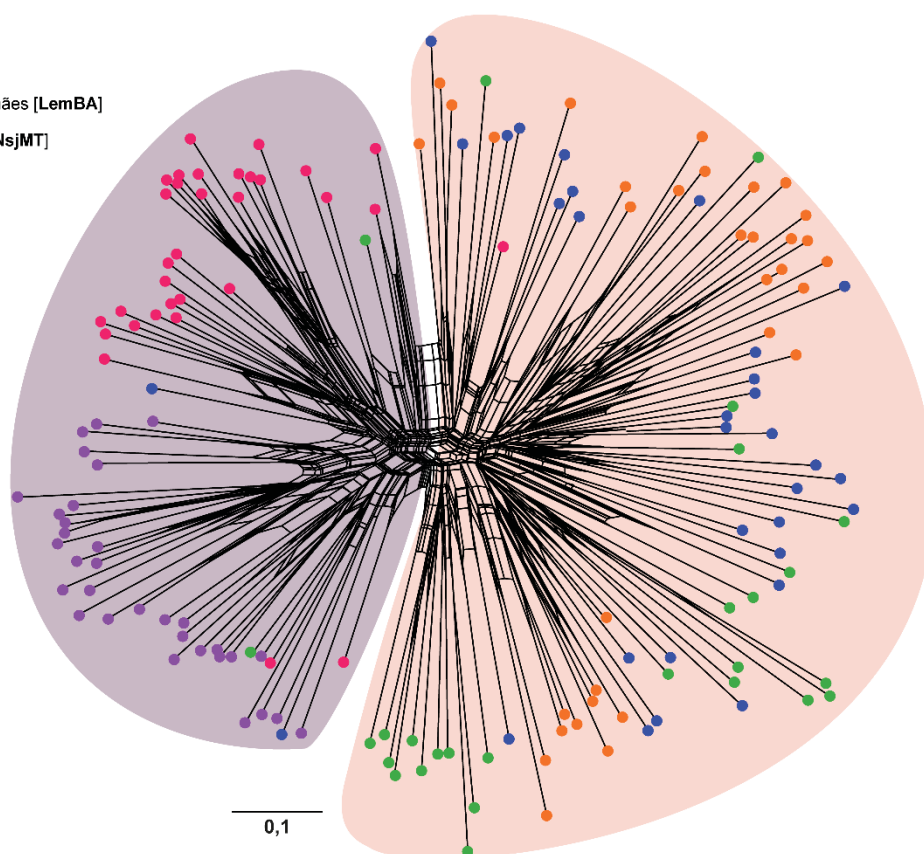


Figura 4. Estrutura genética e relações filogenéticas de cinco populações de *Anticarsia gemmatilis* estimadas a partir de nove *loci* SSR. **A)** Análise de agrupamento Bayesiano, realizada pelo software *Structure*, mostrando o bar plot de $K = 2$, designado pelo método de Evanno ($\Delta K = 495.510998$) como número

ótimo de K agrupamentos para a amostragem, e o bar plot de $K = 4$, designado pelo método de Evanno ($\Delta K = 17.007028$) como segundo melhor K . **B)** Neighbor-Net, inferida pelo software *SplitsTree*, mostrando as relações filogenéticas entre cinco populações de *Anticarsia gemmatalis*, a partir da distância de Prevosti. Cores de fundo codificadas de acordo com os dois grupos genéticos designados pelo software *Structure*.

O resultado da Neighbor-Net construída no software *SplitsTree* a partir da distância de Prevosti não mostrou uma estruturação genética clara para as populações amostradas, à exceção de LemBA e NsjMT. Essas populações, inclusive, se mostraram mais geneticamente relacionadas (**Figura 4**), corroborando, com os dados apresentados pelo *Structure* ($K = 2$). Porém, a análise da Coordenada Principal (PCoA), inferida a partir da distância de Prevosti, sugere a formação de quatro grupos, onde LemBA e NsjMT se apresentam como grupos genéticos distintos (cluster 1 – LemBA, 2 – NsjMT, 3 – MoGO e LonPR, e 4 – CaRS) (**Figura 5**), reafirmando o segundo melhor K ($K = 4$) designado pelo programa *Structure* (**Figura 3**).

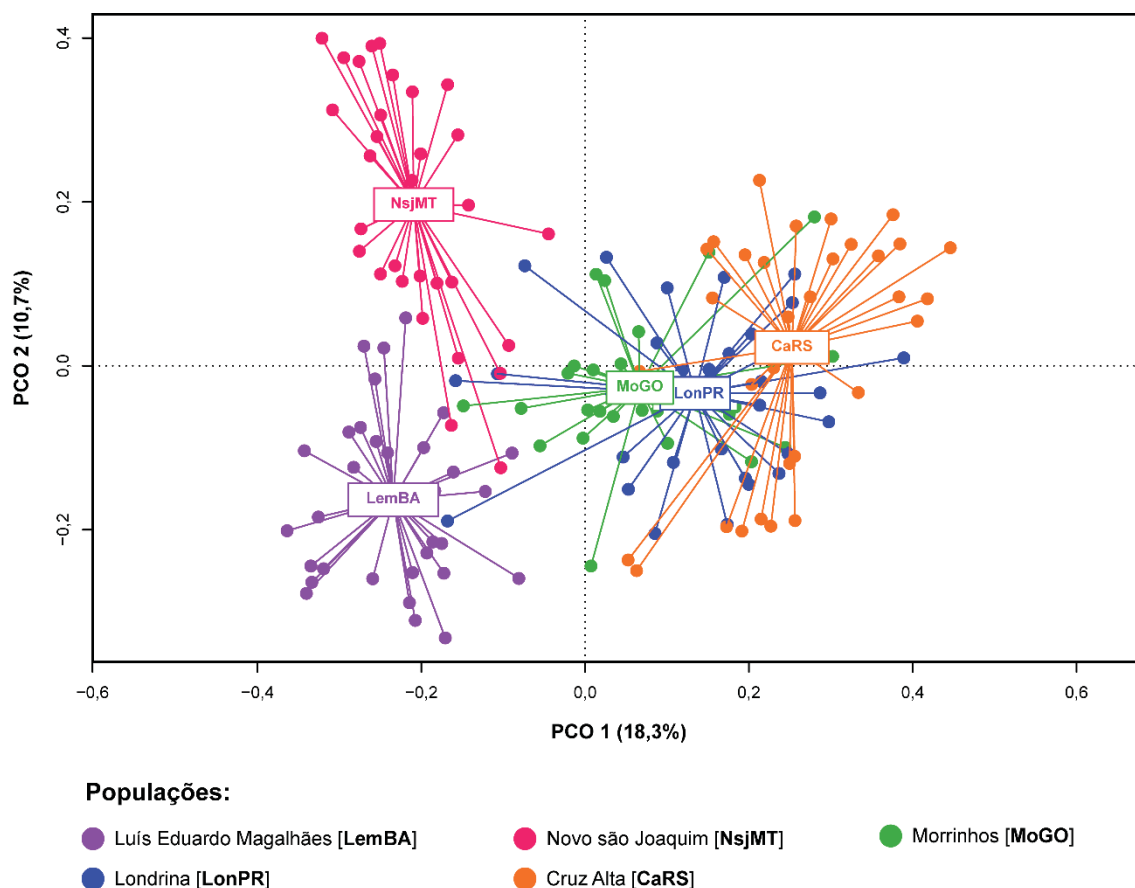


Figura 5. Análise de Coordenadas Principais (PCoA), inferida a partir da distância de Prevosti, para cinco populações de *Anticarsia gemmatalis*.

3.5 DISCUSSÃO

3.5.1 Diversidade genética em *Anticarsia gemmatalis*

Marcadores SSR são considerados excelentes ferramentas para se estimar a diversidade e estrutura genética populações (AHMAD et al., 2018; POWELL et al., 1996). Diferente do observado em *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) que, dentre nove locos SSR testados, apenas seis mostraram produtos de PCR satisfatórios (PAVINATO et al., 2013), os resultados obtidos neste estudo, revelam a eficácia dos marcadores em estimar os índices de diversidade e estrutura genética de *A. gemmatalis*, uma vez que, os nove locos utilizados mostraram-se altamente informativos, como observado através dos altos valores obtidos de conteúdo de informação

polimórfica (PIC) (BOTSTEIN et al., 1980). Além de apresentarem bons padrões de amplificação e altos valores de PIC, a ausência de desequilíbrio de ligação, observado nos nove loci de SSR, evidencia o alto potencial desses marcadores para análise da dinâmica populacional de *A. gemmatalis*, possibilitando recuperar informações úteis para a compreensão do potencial adaptativo e evolutivo da espécie (FRANKHAM et al., 2010), além de contribuir para o desenvolvimento de alternativas que visem o seu manejo integrado.

Os 134 alelos, recuperados a partir de 155 amostras distribuídas em cinco populações de *A. gemmatalis*, evidenciaram níveis moderados de diversidade genética. Resultados estes que diferem de estudos previamente realizados com a espécie, nos mesmos estados brasileiros, a partir DNA mitocondrial, onde foi observada baixa diversidade genética em *A. gemmatalis* (YANO, 2012). Também estudos realizados a partir de marcadores RAPD mostraram uma alta similaridade entre as populações de *A. gemmatalis* brasileiras, além de uma maior ligação entre as populações do Brasil e dos Estados Unidos do que entre populações do Brasil e Argentina (SOSA-GÓMEZ, 2004). Porém, de um modo geral, diversos trabalhos com insetos praga das ordens hemíptera e lepidóptera, têm evidenciado elevados níveis de diversidade genética nas populações estudadas (FONTES et al., 2012; DOMINGUES et al., 2012; DICKEY et al., 2013; KIRK et al., 2013; SUN et al., 2015; TANG et al., 2015; LEITE et al., 2017; HUSCH et al., 2018; ARIAS et al., 2019).

A média de alelos (A) por população foi superior ($A = 72$) (Tabela 3) ao encontrado em outros estudos com espécies de importância agrícola, como *Chloridea* (= *Heliothis*) *virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae) (DOMINGUES et al., 2012) e *S. frugiperda* (ARIAS et al., 2019), porém, a média de alelos efetivos (A_e) por população foi 4,19. A diferença entre o número de alelos efetivos e o número médio de alelos, é devido a presença de alelos raros (frequência $\leq 0,05$) (CARVALHO et al., 2010).

O número de alelos raros (A_r) foi relativamente alto, com média de 32 por população, sendo maior em LonPR (45) e menor em NsjMT e CaRS (23) (Tabela 3). Alelos raros, que, usualmente, são esperados ocorrerem em baixa frequência, tendem a ser perdidos por deriva genética, em detrimento da fixação de outros alelos nas populações (GANDARA & KAGEYAMA, 1998). Portanto, a presença de níveis elevados de alelos raros nas população de *A. gemmatalis*,

sugere que a diversidade encontrada na espécie pode não se manter por muito tempo, devido à baixa frequência desses alelos nas populações que tendem a serem perdidos por deriva genética.

Com relação à média da heterozigosidade observada ($H_O = 0,48$), os resultados mostram que foi menor que a heterozigosidade esperada ($H_E = 0,68$) (Tabela 3), sendo esses índices superiores aos encontrados por Domingues et al. (2012) para *C. virescens*, que também apresentaram estruturação genética moderada. A diferença observada entre H_E e H_O é evidenciada pelo teste exato do Equilíbrio de Hardy e Weinberg, o qual indica desvio nas proporções do equilíbrio para todas as populações de *A. gemmatalis*. Segundo Hartl (2008), diferenças significativas entre H_O e H_E podem ser influenciadas por eventos que alteram a frequência dos genótipos homozigotos em relação a frequência dos genótipos heterozigotos, aumentando, inclusive, o valor de F_{IS} (coeficiente de endogamia). Resultado que se confirma neste trabalho, em que a maioria das populações foram significativas para o F_{IS} positivo, o qual evidencia uma maior proporção de homozigotos em relação aos heterozigotos. Somados aos alelos raros, os valores de F_{IS} apontam para uma diminuição da diversidade genética.

A presença de alelos nulos, em proporção considerável, em *A. gemmatalis*, também foi reportada por outros autores em diferentes espécies de lepidópteros (PAVINATO et al., 2013; DOMINGUES et al., 2012). A frequência de alelos nulos parece ser maior em lepidópteros quando comparado a outras ordens de insetos (JI et al., 2003), sendo comum, provavelmente, pela alta taxa de mutação que ocorre nestes marcadores (DAKIN & AVISE, 2004). A consequência é uma diminuição da frequência de heterozigotos na população resultando na superestimação dos valores de endogamia (PEMBERTON et al., 1995), fator que, também, pode alterar o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Entretanto, mesmo a frequência dos alelos nulos nas populações de *A. gemmatalis* sendo relativamente alta, não houve diferenças significativas entre os valores de F_{ST} global com correção para alelos nulos e o valor estimado sem correção, indicando que presença de alelos nulos não afeta a estimativa de diferenciação genética entre as populações (Tabela 5).

O teste para o efeito de gargalo genético indicou que apenas a população CaRS experimentou uma redução recente do seu tamanho populacional, no modelo de alelos infinitos (IAM) (Tabela 8), que pressupõe que cada mutação

cria um novo alelo (MEIRMANS & HEDRICK, 2011). Entretanto, este modelo não é o mais apropriado para microssatélites, de maneira que, podemos considerar ausência de eventos de gargalo genético atuando nas populações de *A. gemmatalis*. Este possível efeito de gargalo estar relacionado a táticas de manejo que alteram as frequências de alelos ao longo do tempo, uma vez que, podem reduzir drasticamente a densidade populacional do inseto e determinar a ocorrência de eventos de gargalo genético (DOMINGUES et al., 2012).

3.5.2 Estrutura genética de populações em *Anticarsia gemmatalis*

A análise da variância molecular (AMOVA) para as populações de *A. gemmatalis* indica que a maior parte da diversidade genética está distribuída dentro das populações (85,96%) e aponta menor diversidade entre populações (14,04%). Resultados semelhantes foram encontrados para *A. gemmatalis* com uso de sequências de DNA mitocondrial (YANO, 2012) e outras espécies de importância agrícola utilizando microssatélites, RAPD e AFLP (MARTINELLI et al., 2006; MARTINELLI et al., 2007; ALBERNAZ, 2012; PAVINATO et al., 2013; DOMINGUES et al., 2012). A elevada diversidade genética dentro de populações indica a possibilidade de ocorrerem novas combinações genotípicas, mantendo o potencial evolutivo e a capacidade de adaptação das espécies a possíveis mudanças ambientais ou agrícolas (FUTUYAMA, 1992).

A análise bayesiana de agrupamento genético, realizada pelo software *Structure* (Figura 4; Figura 5), indicou um melhor valor de delta K para $K = 2$, que foi o mais congruente com as análises de agrupamento da Neighbor-Net (Figura 5), que separa as populações de LemBA e NsjMT das populações MoGO, LonPR e CaRS, porém, com menor estruturação. O segundo melhor delta K foi $K = 4$ que também pode representar os dados, coincidindo com a análise de coordenadas principais (PCoA) (Figura 6), que permite visualizar as populações LemBA e NsjMT como duas populações distintas e isoladas. Mais ao sul, CaRS se mostrou como terceiro um agrupamento e LonPR e MoGO permaneceram em um quarto grupo, onde as populações se encontram menos estruturadas. Estas diferenças entre as populações podem estar relacionadas à forte seleção e deriva genética, causada por diferentes práticas de manejo, como a aplicação excessiva de inseticidas e safras geneticamente modificadas que

expressam a proteína *B. thuringiensis*, como exemplo a soja Bt (DOMINGUES et al., 2012; BEHERE et al., 2013; CORRÉA et al., 2017). Nesta análise de agrupamento foi possível observar que as populações de LemBA e NsjMT encontram-se mais homogêneas dentro de si, enquanto que, as populações de MoGo e LonPR apresentaram maior porcentagem de indivíduos migrantes entre elas, o que explica a maior diversidade genética dessas populações. Para Freeland (2005), altos níveis de fluxo gênico e grandes populações, como pode ser o caso de *A. gemmatalis*, são determinantes para manutenção de altos níveis de diversidade genética e baixa diferenciação populacional. Leite et al. (2017), estudando a diversidade genética em populações de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) encontraram resultados semelhantes para as populações de *H. zea*, com alta diversidade intrapopulacional, mas baixa diferenciação genética, que justifica que os imigrantes anuais provavelmente vêm do mesmo local, misturando populações de grandes áreas geográficas (por exemplo, sul dos Estados Unidos, México e América Central).

Portanto, a ocorrência de indivíduos migrantes nessas populações (MoGO = 32%/ LonPR = 12%) poderia ser explicada pela alta taxa de fluxo gênico entre as mesmas no sentido sul – centro-oeste. De acordo com a análise realizada pelo software *BayesAss*, as maiores taxas de migração ocorreram de Londrina para Goiás (28%) e Rio grande do Sul para Londrina (8%), a segunda pode ter ocorrido por se tratar de populações pertencentes à região sul do Brasil (Tabela 7). Estas altas taxas de fluxo gênicos estão relacionadas com a época que foram coletadas (dezembro e janeiro), período de maior presença de *A. gemmatalis* nas lavouras de soja, comprovado com monitoramento através de armadilhas luminosas. Sosa-Gómez et al. (2004), utilizando marcadores RAPD encontraram menor variabilidade na população de Londrina dentre as populações de *A. gemmatalis*, com apenas uma larva de Passo Fundo (RS) sendo incluída neste agrupamento, o que não foi observado no presente estudo. Diversos trabalhos sugerem que a possível rota de migração das mariposas de importância agrícola podem estar sendo influenciadas por correntes de ventos. Nagoshi et al. (2017) relataram que a dispersão de *S. frugiperda* é de norte a sul na América do Sul, consistente com o padrão de vento predominante em baixas altitudes, o qual promove a dispersão de mariposas por centenas de quilômetros.

Este padrão de dispersão de norte a sul na América do Sul pode ser comum a outras pragas polípagas, o que explica o fluxo gênico desses insetos entre as Américas do Sul e do Norte (NAGOSHI et al., 2016, 2017). Insetos praga migrantes são uma grande preocupação em relação ao risco de alelos de resistência se espalharem rapidamente por uma ampla área (ARIAS et al., 2019), uma vez que, se a resistência ao Bt ou aos inseticidas surgir em uma área ou cultura, a migração e a dispersão podem espalhar os alelos de resistência rapidamente (LEITE et al., 2017).

Independentemente da moderada estruturação observada na AMOVA e análises de agrupamento, o teste de Mantel não mostrou correlação significativa estatisticamente entre as distâncias genéticas e distâncias geográficas (Tabela 8) para as populações de *A. gemmatalis*. Estudos realizados com a mesma espécie coletadas na Florida, Brasil e Argentina, porém com marcadores RAPD, apresentam as populações geograficamente distintas (SOSA-GÓMEZ et al., 2004).

Diante do cenário agrícola atual, com aumento da área cultivada com soja e outras culturas hospedeiras, geneticamente modificadas, a cada ano, tornam-se necessário estudos moleculares que permitam compreender como populações das principais pragas se comportam no decorrer dos anos. Informações de populações de *A. gemmatalis*, podem contribuir para um melhor entendimento da espécie, uma vez que, o fluxo gênico intenso pode aumentar em determinadas épocas do ano.

Com a maioria das áreas agrícolas do território brasileiro sendo cultivadas com plantas Bt, o foco tem sido a estratégia de áreas de refúgio, com plantas hospedeiras que não expressam as proteínas de *B. thuringiensis* (GOULD, 1998). Entretanto, a eficiência dessa estratégia depende da taxa de dispersão dos alelos suscetíveis entre a área de refúgio e campos transgênicos, uma vez que, os efeitos do fluxo gênico podem ter reflexos em diferentes dimensões (DOMINGUES, 2012). Em relação a populações locais, ou seja, quando os efeitos são em pequena escala, espera-se que ocorra a diluição da resistência levando o cruzamento de insetos resistentes e não resistentes. Sendo que a capacidade de dispersão de um inseto praga é relevante para definição do tamanho e distribuição das áreas de refúgio, uma vez que, estas são os locais para a manutenção de insetos suscetíveis, tornando possível o fluxo de genes

não-resistentes a insetos resistentes nas áreas de plantas Bt (VACHER et al., 2006). Quando os efeitos do fluxo gênico se dá em grande escala, tem a possibilidade dos genes que determinam a resistência se espalharem ao longo da área de distribuição geográfica da espécie. Esse fenômeno intervém na velocidade com que uma adaptação que surge em uma população local pode se disseminar (MACHADO & FIÚZA, 2010)

3.6 CONCLUSÃO

Os locos microssatélites foram eficientes para caracterizar a diversidade e estrutura dentro e entre as populações de *A. gemmatalis* no Brasil. As populações apresentaram níveis moderados de diversidade genética, não havendo diferença significativa estatisticamente entre elas. Foi encontrada uma maior variação genética dentro de populações do que entre populações. A alta diferenciação genética entre as populações e a alta taxa de migrantes indica fluxo gênico elevado, que podem influenciar no manejo integrado de pragas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da ocorrência de *A. gemmatalis* em campos de soja no Brasil, os estudos realizados neste trabalho contribuíram para o manejo resistência dentro do manejo integrado de pragas (MIP) da espécie. No capítulo II, com efeito sinergista observado, Fluorescent Brightener 28 pode ser uma alternativa para uso em formulações de bioinseticidas para o controle de *A. gemmatalis* resistente a proteína Cry1Ac, resultado relevante caso a espécie apresente genótipos resistentes a tecnologia Bt. No entanto, sua interação com estes produtos a campo deve ser estudada, bem como seu comportamento em situações de infestação natural, a fim de determinar concentrações que sejam viáveis economicamente em formulados comerciais. Portanto, o estudo abre novas perspectivas para investigar as interações fisiológicas que ocorrem frente a quebra de resistência nas populações de Cry1Ac resistentes, além de instigar empresas a pesquisar substâncias semelhantes ao FB 28, com ação sinérgica e custo inferior.

Por fim, o capítulo III, desenvolveu uma biblioteca enriquecida de microssatélites para *A. gemmatalis* quanto a construção e validação dos primers e mostrou diversidade genética moderada, baixa estruturação e elevado fluxo gênico de populações de *A. gemmatalis* distribuídas em cinco estados brasileiros com alta produtividade de soja no decorrer dos anos. Esses resultados comprovam que estes insetos-pragas podem trocar alelos de resistência entre eles e dificultar a eficácia de medidas de controle.

3.7 REFERÊNCIAS

AHMAD A.; WANG, J.D.; PAN, Y.B.; SHARIF, R.; GAO, S.J. Development and Use of Simple Sequence Repeats (SSRs) Markers for Sugarcane Breeding and Genetic Studies. **Agronomy**, v. 8, p. 1-20, 2018.

ALBERNAZ, K. C.; SILVA-BRANDÃO, K. L.; FRESIA, P.; CÔNSOLI, F. L.; OMOTO, C. Genetic variability and demographic history of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil inferred by mtDNA sequences. **Bulletin of Entomological Research**, v. 102, p. 333-343, 2012.

ARIAS, O.; CORDEIRO, E.; CORRÊA, A. S.; DOMINGUES, F. A.; GUIDOLIN, A. S.; OMOTO, C. Population genetic structure and demographic history of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): implications for insect resistance management programs. **Pest Management Science**, v. 75, p. 2948–2957, 2019.

BEHERE, G. T.; TAY, W. T.; RUSSEL, D. A.; KRANTHI, K. R.; BATTERHAM, P. Population genetic structure of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) in India as inferred from EPIC-PCR DNA markers. **Plos One**, v. 8, 2013.

BESNIER, F.; GLOVER, K.A. Parallel Structure: A R Package to distribute parallel runs of the population genetics program STRUCTURE on Multi-Core Computers. **Plos One**, v. 8, 2013.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. **Bioinformatics**, v. 30, p. 2114-2120, 2014.

BRYANT, D.; MOULTON, V. Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. **Molecular Biology Evolution**, v. 21, p. 255-65, 2004.

CAPRIO, M.A.; TABASHNIK, B.E. Local adaptation and gene flow among finite populations simulation of evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 611-620. 1992.

CARVALHO, A.C.M.; FREITAS, M.L.M.; MORAES, S.M.B.; MORAES, M.L.T.;

STRANGHETI, V.; ALZATE-MARIN, A.L.; SEBBEN, A.M. Diversidade genética, endogamia e fluxo gênico em pequena população fragmentada de *Copaifera langsdorffii*. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, p. 599-606, 2010.

CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 621–631, 2007.

CHAPUIS, M. P.; POPPLE, J. M.; BERTHIER, K.; SIMPSON, S. J.; DEVESON, E.; SPURGIN, P.; STEINBAUER, M. J.; SWORD, G. A. Challenges to assessing connectivity between massive populations of the Australian plague locust. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 278, p. 3152-3160, 2011.

CHEN, M. H.; DORN, S. Cross-amplification of microsatellites from the codling moth *Cydia pomonella* to three other species of the tribe Grapholitini (Lepidoptera: Tortricidae). **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 1034-1037, 2010.

CONTE, O.; POSSAMAI, E. J.; SILVA, G. C.; REIS, E. A.; GOMES, E. C.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; ROGGIA, S.; PRANDO, A. M. Resultados do manejo integrado de pragas da soja na safra 2019/2020 no Paraná. **Documentos 421**, Embrapa Soja, p. 66, 2020.

CORRÊA, A.; VINSON, C.; BRAGA, L.; GUESDES, R.; OLIVEIRA, de L. Ancient origin and recent range expansion of the maize weevil *Sitophilus zeamais*, and its genealogical relationship to the rice weevil *S. oryzae*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 107, p. 9–20, 2017.

DAKIN, E.E.; AVISE, J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, p. 504 – 509, 2004.

DOMINGUES, F. A.; SILVA-BRANDÃO, K. L.; ABREU, A. G.; PERERA, O. P.; BLANCO, C. A.; CÔNSOLI, F. L.; OMOTO, C. Genetic structure and gene Flow Among Brazilian Populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 105, p. 2136–2146, 2012.

DICKEY, A. M.; OSBORNE, L. S. SHATTERS, R. G.; HALL, P. M.; McKENZIE, C. L. Population Genetics of Invasive *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Cryptic Species in the United States Based on Microsatellite Markers. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, p. 1355-1364, 2013.

EVANNO, G; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611–2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p.479–491, 1992.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, v.1, p. 47–50, 2005.

FONTES, F. H. M.; COLOMBO, C. A.; LOURENÇÃO, A. L. Structure of genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) populations in Brazilian crops and locations. **Scientia agricola**, v. 69, p. 47-53, 2012.

FORD, B.J.; STRAYER, J.R.; GOFREY, G.L. The literature of arthropods associated with soybean. IV. A biography of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera Noctuidae). **Natural History Survey**, v. 92, p. 15, 1975.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. Fundamentos de Genética da Conservação. 1st ed. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, SP, p. 280, 2008.

FREELAND, J. R. Molecular Ecology. John Wiley & Sons, **Chichester**, UK, 2005.

FUTUYAMA, D. J. Biologia Evolutiva. 2 ed. **Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética**, p. 631, 1992.

GANDARA, F.B.; KAGEYAMA, P.Y. Indicadores de sustentabilidade de florestas naturais. **Série Técnica IPEF**, v. 12, p. 79-84, 1998.

GAZZONI, D.L., MOSCARDI, F. Effect of defoliation levels on recovery of leaf area, on yield and agronomic traits of soybeans. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, p. 411-424, 1998.

GEORGHIOU, G.P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. (Ed). **Pest resistance to pesticides**, p. 769-792, 1983.

GOUDET, J.; JOMBERT, T. Hierfstat: estimation and tests of hierarchical F-statistics. R package version 0.04-22. 2015. <https://CRAN.R-project.org/package=hierfstat>. Acesso em: 20 fev. 2021.

GOULD, F. Evolutionary biology and genetically engineered crops. **Bioscience**, Washington, v. 38, p. 26-33, 1988a.

GOULD, F. Genetic engineering, integrated pest management, and the evolution of pests. **Trend in Biotechnology**, Amsterdam, v. 6, p. 15-19, 1988a.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 701 – 726, 1988b.

GOULD, F. The evolutionary potential of crop pests. **American Scientist**, v. 79, p. 496-507, 1991.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 701 – 726, 1998.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; DI PALMA, F.; BIRREN, B. W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, p. 644-52, 2011.

GUSE, C.A.; ONSTAD, D.W.; BUSCHMAN, L.P.; PORTER, L.; HIGGINS, R.A.; SLODEBECK, P.E.; CRONHOLM, G.B.; PEAIRS, F.B. Modeling the

development of resistance by stalk-boring lepidoptera (Crambidae) in areas with irrigated transgenic corn. **Environmental Entomology**, v. 31, p. 676-685, 2002.

HANSEN, Z. R.; EVERTS, K. L.; FRY, W. E.; GEVENS, A. J., GRÜNWALD, N. J.; GUGINO, B. K.; JOHNSON, D. A.; JOHNSON, S. B.; JUDELSON, H. S.; KNAUS, B. J.; MCGRATH, M. T.; MYERS, K. L; RISTAINO, J. B.; ROBERTS, P. D.; SECOR, G. A.; SMAR, C. D. Genetic variation within clonal lineages of *Phytophthora infestans* revealed through genotyping-by-sequencing and implications for late blight epidemiology. **Plos One**, v.11, 2016.

HERZOG, D.C.; TODD, J.H. Sampling velvetbean carterpillar on soybean. p. 107-140. In: M. Kogan; D.C. Herzog. **Sampling methods in soybean entomology**, p. 587, 1980.

HARTL, D. L. Princípios de genética de população. 3 ed. **Ribeirão Preto: FUNPEC**, 2008.

HARTL, D. L.; CLARK, A.G. Principles of Population Genetics. **Sinauer Associates**, v. 4, p. 565, 2006.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F. CÔRREA-FERREIRA, B.S.; OLIVEIRA, L.J.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; PANIZZI, A.R.; CORSO, I.C.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. **Londrina: Embrapa Soja**, Circular Técnica, n.30, p. 70, 2000.

HUSCH, P. E.; FERREIRA D. G.; SERAPHIM, N.; HARVEY, N.; SILVA-BRANDÃO, K. L.; SOFIA, S. H.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Structure and genetic variation among populations of *Euschistus heros* from different geographic regions in Brazil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 166, p. 191-203, 2018.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology Evolution**, v. 23, n. 2, p. 254-67, 2006.

JEROME, G.; THIBAUT, J. (2020). Hierfstat: Estimation and Tests of Hierarchical F-Statistics. R package version 0.5-7. <https://CRAN.R-project.org/package=hierfstat>. Acesso em: 02 fev. 2021.

JI, Y. J.; ZHANG, D. X.; HEWITT, G. M.; KANG, L.; Li, D. M. Polymorphic microsatellite loci for the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and some remarks on their isolation. **Molecular Ecology**, v. 3, p. 102–104, 2003.

KAMVAR, Z.N.; BROOKS, J. C.; GRÜNWALD, N.J. Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. **Frontiers in Genetics**, v. 6, 2015.

KAMVAR, Z. N.; TABIMA, J.F.; GRÜNWALD, N.J. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. **PeerJ**, v.2, 2014.

KIRK, H.; DORN, S.; MAZZI, D. Worldwide population genetic structure of the oriental fruit moth (*Grapholita molesta*), a globally invasive pest. **BioMed Central Ecology**, v. 13, p. 2-12, 2013.

KOPELMAN, N.M.; MAYZEL J.; JAKOBSSON M.; ROSENBERG, N. A.; MAYROSE I. CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, p. 1179–1191, 2015.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. Numerical Ecology. **Amsterdam: Elsevier**, 1006 p., 2012.

LEITE, N. A.; CORREA, A. S.; MICHEL, A. P.; ALVES-PEREIRA, A.; PAVINATO, V.A.C.; ZUCCHI, M. I.; OMOTO, C. Pan-American similarities in genetic structures of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) with implications for hybridization. **Molecular Ecology and Evolution**, v. 0, p. 1-11, 2017.

MACHADO, V.; FIUZA, L. M. Evolução e manejo da resistência de insetos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 38, p. 68-74, 2010.

MARTEL, C.; RÉJASSE, A.; ROUSSET, F.; BETHENOD, M. T.; BOURGUET, D. Host-plant associated genetic differentiation in Northern French populations of the European corn borer. *Heredity*, v. 90, p. 141-149, 2003

MARTINELLI, S.; BARATA, R. M.; ZUCCHI, M. I.; SILVA-FILHO, M. C.; FOSTER, J. E.; OMOTO, C. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 99, p. 519-526, 2006

MARTINELLI, S.; CLACK, P. L.; ZUCCHI, M. I.; SILVA-FILHO, M. C.; FOSTER, J. E.; OMOTO, C. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. **Bulletin Entomology Research**, v. 97, p. 225–231, 2007.

MEIRMANS, P. G.; HEDRICK, P. W. Assessing population structure: FST and related measures. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 5-18, 2011

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees In: Proceedings of the Gateway **Computing Environments Workshop (GCE)**, p. 1–8, 2010.

NAGOSHI, R. N.; GILLIGAN, T. M.; BRAMBILA, J. Combining Tpi and CO1 genetic markers to discriminate invasive *Helicoverpa armigera* from local *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the Southeastern United States. **Journal Economic of Entomology**, v. 109, p. 2115–2124, 2016.

NAGOSHI, R. N.; FLEISCHER, S.; MEAGHER, R. L.; HAY-ROE, M.; KHAN, A.; MURÚA, M. G.; SILVIE, P.; VERGARA, C.; WESTBROOK, J. Fall armyworm migration across the Lesser Antilles and the potential for genetic exchanges between North and South American populations. **Plos One**, v. 12, 2017.

OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; FRIENDLY, M.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; McGLINN, D.; MINCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; SIMPSON, G. L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H. H.; SZOECS, E.; WAGNER, H. (2018) Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-2. Available at: <https://cran.r-project.org/package=vegan>. Acesso em: 31 out. 2020.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 294-307, 2006.

PAVINATO, V. A.; MARTINELLI, S.; DE LIMA, P. F.; ZUCCHI, M. I.; OMOTO, C. Microsatellite markers for genetic studies of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Genetics and molecular research**, v. 12, p. 370-380, 2013.

PEMBERTON, J. M.; SLATE, J.; BANCROFT, D. R.; BARRET, J. A. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. **Molecular Ecology**, v. 4, p. 249-352, 1995.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 502-503, 1999.

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 215–222, 1996.

PREVOSTI, A.; OCANA, J.; ALONSO, G. Distances between populations of *Drosophila subobscura*, based on chromosome rearrangement frequencies. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 45, p. 231–241, 1975.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155, p.945-59, 2000.

QGIS Development Team. (2016) QGIS 2.14.0 Geographic information system. Open source geospatial foundation project. Available at: <https://www.qgis.org/en/site/> Acesso em: 31 out. 2020.

R Core Team. (2018) R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. <https://www.r-project.org/>. (Acesso em: 14 dez. 2018).

R Core Team. (2020) R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Available at: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 02 fev. 2021.

RAHMAN, M. M.; Rashid, H.; SHAHID, A. A.; BASHIR, K.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. Insect resistance and risk assessment studies of advanced generations of basmati rice expressing two genes of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Electronic Biotechnology**, v. 10, p. 241-251, 2007.

RAMBAUT, A.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; DRUMMOND, A. J. (2014) Tracer: a program for analyzing results from Bayesian MCMC programs, Version 1.6. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. Acesso em: 14 dez. 2018.

ROGER, S.O.; BENDICH, A.J. Extraction of DNA from plant issues. **Plant molecular biology**, v. 79, p. 1-18, 1988.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p.103-106, 2008.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234, 2000.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; HUMBER, R.; MOSCARDI, F. Entomopathogens associated with soybean/wheat production systems in Brazil and Argentina. In: SIP 35th, Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology. Foz de Iguaçu, p. 75, 2002.

SOSA-GÓMEZ, D.R. Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, p. 378-384, 2004.

SPECHT, A.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; RIOS, D. A. M.; CLAUDINO, V. C. M.; PAULA-MORAES, S. V.; MALAQUIAS, J. V.; SILVA, F. A. M.; ROQUE-SPECHT, V. F. *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil: the Big Outbreak Monitored by Light Traps. **Neotropical Entomology**, v. 50, p. 53-67, 2021.

SUN, W.; DONG, H.; GAO, Y. B.; SU, Q. F.; QIAN, H. T.; BAI, H. Y.; ZHANG, Z. T.; CONG, B. Genetic variation and geographic differentiation among populations of the nonmigratory agricultural pest *Oedaleus infernalis* (Orthoptera: Acridoidea) in China. **Journal of Insect Science**, v. 15, p. 150, 2015.

TANG, X. T.; TAO, H. H.; DU, Y. Z. Microsatellite-based analysis of the genetic structure and diversity of *Aleurocanthus spiniferus* (Hemiptera: Aleyrodidae) from tea plants in China. **Gene**, v. 560, p.107-13, 2015.

THIEL, T.; MICHALEK, W.; VARSHNEY, R.; GRANER, A. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 411-422, 2003.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, S. G. Primer3-new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 115, 2012.

VACHER, C.; BOURGUET, D.; DESQUILBET, M.; LEMARIE, S.; AMBEC, S.; HOCHBERG, M. E. Fees or refuges: which is better for the sustainable management of insect resistance to transgenic Bt corn? **Biology Letters**, v. 4, p. 535-538, 2004.

VALLE, G. E.; LOURENÇÃO, A. L.; ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; ABREU, A. G. Population variability of *Bemisia tabaci* (Genn.) in different hosts. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, p. 4615-24, 2013.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. **Evolution**, v. 38, p.1358–1370, 1984.

WILSON, G. A.; RANNALA, B. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. **Genetics**, v. 163, n. 3, p.1177–1191, 2003.

YANO, S. A. C. Analise de risco para manejo da resistência a toxina Cry1Ac e inseticidas convencionais e estudos de diversidade genética de *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) e *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) NO BRASIL. Tese (Doutorado), 2012.

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. POPGENE: Microsoft Windows-Based Freeware for Population Genetic Analysis. Release 1.31. **University of Alberta**, Edmonton (Alberta), 1999. Tese (Doutorado), 2012.